PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG RIBOSOMALER tRNA-BINDESTELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ludwig Bispink
aus Wilsum

Göttingen 1976

PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG RIBOSOMALER tRNA-BINDESTELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ludwig Bispink
aus Wilsum

Göttingen 1976

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Matthaei
Korreferent: Prof. Dr. G. Jacobi
Mündliche Prüfung: 30. April 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Bei meinem Lehrer Prof. Dr. H. Matthaei möchte ich mich für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die persönliche Förderung bedanken.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1974 bis Dezember 1975 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Genetik, durchgeführt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0031

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN 1

ZUSAMMENFASSUNG 3

A EINLEITUNG. 4

B MATERIAL UND METHODEN 12

1. Chemikalien und sonstiges Material 12

2. Präparation von Ribosomen. 14

3. Aminoacylierung von tRNA 14

4. Darstellung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ . . 14

5. UV-Bestrahlung 17

6. Präparation von Elongationsfaktoren. 20

7. Messung der nichtenzymatischen und enzymatischen AA-tRNA-Bindung an Ribosomen. 20

8. Messung der mRNA-abhängigen Polypeptidsynthese . . . 20

9. Messung der Radioaktivität 21

10. Messung der irreversiblen Bindung von Acyl-Phe-$tRNA^{Phe}$-Derivaten an Ribosomen 21

11. Analytische Trennung ribosomaler Untereinheiten. . . 22

12. Essigsäure-Extraktion von Proteinen. 22

13. Isolierung ribosomaler RNA 23

14. Analytische Spaltung von 23S-RNA in zwei Fragmente . 23

15. Auftrennung von rRNA-Spaltprodukten in Polyacrylamid-Gelen. 24

16. Messung einer irreversiblen Bindung von Val-$tRNA^{Val}$ an Ribosomen 24

17. Tritiierung von $tRNA^{Val}$ 25

18. Spaltung von $tRNA^{Val}$ mit RNase T_1. 25

19. Dünnschichtchromatographische Trennung der Oligonucleotide von $tRNA^{Val}$ 26

20. Analyse der Oligonucleotide. 27

21. UV-Absorptionsspektren 27

C PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG VON 23S-rRNA MIT ÄTHYL-2-DIAZOMALONYL-PHE-tRNA. 28

1. Komplexbildung zwischen Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA und 70S-Ribosomen. 28

2. Irreversible Bindung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA an 70S-Ribosomen 29

Seite

3. Spezifische Markierung von 23 S-rRNA 31

4. Einfluß veränderter Reaktionsbedingungen auf die Ausbeute an irreversibel gebundener tRNA. 34

5. Einfluß der UV-Bestrahlung auf die Aktivität der Ribosomen. 37

6. Puromycin-Reaktivität von kovalent gebundener N-Acyl-Phe-tRNA 39

7. Kovalente Bindung von Peptidsynthese-Produkten an 23S-rRNA 41

8. Lokalisation der N-Acyl-Phe-tRNA-Markierung im 3'-terminalen Fragment der 23S-rRNA 42

D UV-INDUZIERTE IRREVERSIBLE BINDUNG VON VALIN-SPEZIFISCHER tRNA AN 16S-rRNA. 45

1. Irreversible Bindung von Val-tRNA^{Val} (E.coli) an 70S-Ribosomen. 45

2. Lokalisation der spezifischen Reaktion an der 16S-rRNA 48

3. Spezifität der enzymatischen Bindung von Val-tRNA. . 52

4. Identifizierung kovalent gebundener Oligonucleotide. 53

5. Mechanismus der photochemischen Reaktion von Val-tRNA^{Val} mit 16S-rRNA 61

E DISKUSSION. 64

F LITERATURVERZEICHNIS. 70

ABKÜRZUNGEN

A_{260}	Absorption bei 260 nm
A_{260}-E.	Absorptions-Einheit: Substanzmenge, die in 1 ml Lösung bei einem Lichtweg von 1 cm eine Absorption von 1 ergibt
AA-tRNA	Aminoacyl-tRNA
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit dem ungefähren Atomgewicht 14
2-D	zweidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie
Ci	Curie = 2,22 X 10^{12} Zpm (Maßeinheit für Radioaktivität)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E.	internationale Enzymeinheit
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
^{3}H	Tritium, radioaktives Wasserstoffisotop mit dem Atomgewicht ~ 3
Ipm	Impulse pro Minute
L(1-34)	Proteine der 50S-(von "large subunit") Untereinheit
min	Minuten
mRNA	Messenger- oder Botenribonucleinsäure
n	nano (x 10^{-9})
p	pico (x 10^{-12})
Phe	Phenylalanin
Poly(U)	Polyuridylsäure
Poly(U_2,G)	Polyguanyl-uridylsäure (Mischpolymer mit dem Basenverhältnis G : U = 1 : 2)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Rib	Ribosomen
RNase A	Ribonuclease aus Pankreas (EC 2.7.7.16)
rRNA	ribosomale RNA
S(1-21)	Proteine der 30S-Untereinheit (von "small subunit")

S	Sedimentationskonstante (Svedberg-Einheit, Maß für das Sedimentationsverhalten)
S-100	Überstand nach Zentrifugation bei 100 000xg
SDS	Dodecylsulfat, Na-Salz
spez. Akt.	spezifische Aktivität (Ci/Mol)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
UV	ultraviolette Strahlung
v	Volumen
Val	Valin
Zpm	Zerfälle pro Minute

ZUSAMMENFASSUNG

Zum Zwecke einer Photoaffinitätsmarkierung von E.coli-Ribosomen im Bereich der Peptidyltransferase wurde ein Analogon des Substrates Peptidyl-tRNA – Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ – synthetisiert. UV-Bestrahlung des reversiblen Komplexes mit 70S-Ribosomen und Poly(U) führt zu einer kovalenten Verknüpfung der N-Acyl-Phe-tRNA mit 23S-rRNA. Die irreversibel gebundene N-Acyl-Phenylalanyl-Gruppe kann in einer Peptidyltransferase-katalysierten Reaktion auf Puromycin übertragen werden und bildet in Gegenwart von Phe-tRNA kovalent mit der 23S-RNA verbrückte Produkte einer Peptidsynthese. Die so markierte, noch nicht identifizierte 23S-rRNA-Sequenz dürfte sich demnach im aktiven Zentrum der Peptidyltransferase oder in dessen nächster Umgebung befinden. Eine Analyse des Reaktionsproduktes ergab, daß die N-Acyl-Phe-tRNA spezifisch an eine oder mehrere Stellen eines 3'-terminalen 18S-Fragmentes der 23S-RNA gebunden wird.

Der Versuch, andere Wechselwirkungen von tRNA mit ribosomalen Substratbindestellen nachzuweisen, führte zur Entdeckung einer Poly(U_2,G)-stimülierten, UV-induzierbaren irreversiblen Bindung von Valin-spezifischer tRNA (E.coli) an 16S-rRNA in einer oder mehreren tRNA-Decodierstellen. Eine vorläufige Analyse der T_1-Fragmente von $tRNA^{Val}$ nach der Verknüpfung mit 16S-rRNA weist auf eine Beteiligung der DHU-Schleife der tRNA bei dieser Photoreaktion hin.

A. EINLEITUNG

Die Funktion der Ribosomen bei der Übertragung der genetischen Information in der Nucleinsäure-programmierten Synthese der Proteine ist in Grundzügen aufgeklärt (Übersichtsartikel 1 - 5). Die prinzipiellen Eigenschaften der Ribosomen aus verschiedenen Organismen ähneln sich weitgehend. Am besten untersucht sind die Ribosomen des Bakteriums E s c h e r i c h i a c o l i . Das bakterielle Ribosom ist ein Nucleoprotein-Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. $2{,}7 \times 10^6$ und einer annähernd ellipsoiden Gestalt (Hauptachsen: 200 Å x 200 Å x 135 Å). Auf dem Wege zu einer detaillierten Kenntnis der Struktur sind die ribosomalen Komponenten analysiert und sequenziert worden: Als Bestandteile der größeren 50S-Untereinheit 34 Proteine, die 23S-RNA und die 5S-RNA, als Teile der kleineren 30S-Untereinheit 21 Proteine sowie die 16S-RNA:

Übersichtsartikel:

1. H. Matthaei et al. (1968), Reaktionsschritte der Polypeptidsynthese am Ribosom, Naturwissenschaften 55, 281

2. J. Lucas-Lenard, F. Lipmann (1971), Protein Biosynthesis, Ann. Rev. Biochem. 40, 409

3. R.A. Cox und E. Godwin (1975), Ribosome Structure and Function, MTP International Review of Science, Biochemistry 7, 179

4. H.G. Wittmann (1976), Structure, Function and Evolution of Ribosomes, Eur. J. Biochem. 61, 1

5. Ribosomes (1974) M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory

(Kaltschmidt und Wittmann, 1970; Ehresmann et al., 1972; Wittmann-Liebold, 1973). Damit wurde der Anstoß für zahlreiche Untersuchungen der topographischen Anordnung einzelner molekularer Komponenten gegeben, es zeigte sich aber auch die Notwendigkeit, mehr über die einzelnen Funktionen in der multikatalytischen Einheit Ribosom zu erfahren (Übersichtsartikel 5). Die übergeordnete dreidimensionale Struktur des Ribosoms ist jedoch bisher nur ansatzweise bekannt (Wittmann, 1976) und scheint einer beträchtlichen Konformationsdynamik zu unterliegen (Noll et al., 1973). Als Substrat des Ribosoms kann im engeren Sinne AA-tRNA gelten. Verglichen mit dem Ribosom ist die tRNA ein einfaches Makromolekül. Wie Röntgenstrukturanalysen ergeben haben, hat Phenylalanin-spezifische tRNA eine L-förmige Tertiärstruktur (Kim et al., 1973; Robertus et al., 1974; Kim et al., 1974; Abb. A 1).

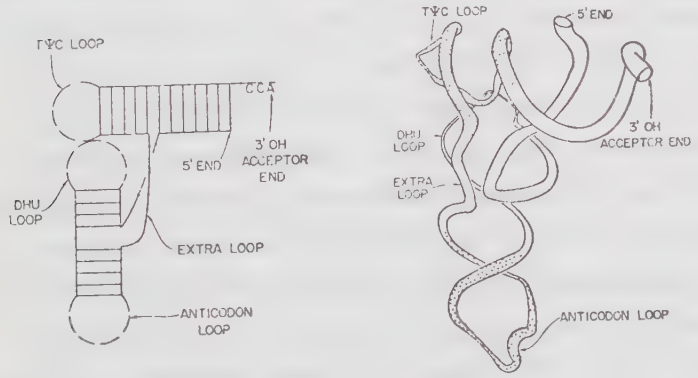


Abb. A 1. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von $tRNA^{Phe}$ (Hefe)

Eine direkte oder indirekte, hochspezifische Wechselwirkung zwischen dem Anticodon einer AA-tRNA und dem dazu komplementären Basentriplett der ribosomgebundenen mRNA ermöglicht den mRNA-codierten Einbau eines jeden Aminosäurerestes in eine Polypeptidkette. An diesem sehr präzisen Erkennungsvorgang sind vermutlich weitere molekulare Strukturen im Komplex von AA-tRNA, mRNA und Ribosom beteiligt (Matthaei et al., 1968; Richter et al., 1973; Shine und Dalgarno, 1975). Auch scheint die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der TΨC-Schleife der tRNA und einer dazu komplementären Sequenz der ribosomalen 5S-rRNA (Erdmann et al., 1973) von der Komplexbindung zwischen Codon und Anticodon beeinflußt zu werden (Schwarz et al., 1974) und vielleicht als Mechanismus einer stabileren Bindung zu dienen, die nach erfolgreicher Erkennung (Diskriminierung) eintritt. Wie sich im Modellbindesystem mit einem 3'-terminalen Fragment der Leucin-spezifischen tRNA, CpApCpCpA-(AcLeu), zeigen läßt (Maden und Monro, 1968), wird das 3'-terminale CpCpA-Ende der AA-tRNA im Peptidyltransferasezentrum, einem Bestandteil der großen Untereinheit, gebunden. Wie schon erwähnt, dürften weitere Erkennungsregionen der tRNA bzw. des Ribosoms an der spezifischen Substratbindung im ribosomalen Komplex beteiligt sein. Ein genaueres Verständnis des Reaktionsablaufs der Proteinbiosynthese setzt die Kenntnis der molekularen Organisation aller ribosomalen Bindestellen voraus.

Die Affinitätsmarkierung - schon länger in der Enzymchemie bekannt (Singer, 1967) - ist als chemische Methode zur Kennzeichnung von Substratbindestellen geeignet. Ein reaktives

Substrat kann aufgrund seiner sterischen Komplementarität spezifisch und reversibel das aktive Zentrum besetzen. Damit wird die Verweilzeit des substratanalogen Reagenz in der Bindestelle erheblich gegenüber anderen Orten der Lösung vergrößert. Die Geschwindigkeit der Reaktion mit einem solchen Reaktionspartner kann dadurch im aktiven Zentrum bzw. in seiner nächsten Umgebung sehr viel größer sein als mit einer ähnlichen funktionellen Gruppe außerhalb der Substratbindestellen. Mit Hilfe von AA-tRNA, die eine alkylierende oder acylierende Gruppe am Aminoacyl-Ende trägt, lassen sich Proteine in der Nachbarschaft der ribosomalen Bindestelle nachweisen (Oen et al., 1973; Czernilofsky et al., 1974). Die Untersuchung der Kinetik derartiger Reaktionen deutet darauf hin, daß nucleophil reagierende Substratanaloga sehr langsam und unvollständig umgesetzt werden (Bispink, 1973), so daß bei der Reaktion besondere Bedingungen (z.B. sehr niedrige Substratkonzentration) eingehalten werden müssen, um genügende Spezifität zu erreichen. Demnach scheint in unmittelbarer Umgebung der reaktiven Gruppe kein geeigneter Reaktionspartner vorhanden zu sein, der eine schnelle, spezifische Reaktion erlaubt. Es wurde deshalb mit der von Westheimer erstmalig beschriebenen Photoaffinitätsmarkierung (Singh, Thornton und Westheimer, 1962; Knowles, 1972) versucht, diese Schwierigkeiten zu umgehen. Diese Methode basiert auf der Verwendung UV-reaktiver Reagenzien. Der besondere Vorteil der photoreaktiven Substratanaloga besteht darin, daß die Reaktivität der UV-sensitiven Gruppen durch die Einstrahlung ultravioletten Lichtes unter

Bedingungen induziert werden kann, die eine hochgradige Spezifität des Reaktionsortes ermöglichen: Die Markierung des aktiven Zentrums der Substratbindestelle bzw. ihrer nächsten Umgebung findet in zwei voneinander unabhängigen und daher getrennt kontrollierbaren Schritten statt. Zunächst wird das Reagenz aufgrund seiner komplementären Struktur reversibel im Komplex gebunden. Da die funktionelle Gruppe unter diesen Bedingungen nicht reaktiv ist, treten keine unerwünschten Nebenreaktionen auf. Bei der nun erfolgenden UV-Bestrahlung entsteht ein kurzlebiges Zwischenprodukt, das in der Folgereaktion mit unmittelbar benachbarten Strukturen reagieren kann, die mit Wahrscheinlichkeit Teile der Substratbindestelle sind. Diazomalonsäureester sind aufgrund ihrer relativ großen Stabilität zur Photoaffinitätsmarkierung geeignet. Die Diazoketogruppe wird durch UV-Bestrahlung in ein Carben umgewandelt. Dieses extrem reaktive Zwischenprodukt mit zwei freien Elektronen am Kohlenstoffatom ermöglicht eine Vielzahl verschiedener Folgereaktionen mit entsprechenden Reaktionspartnern (Abb. A 2). Damit ist im Bereich des Ribosoms prinzipiell eine Reaktion sowohl mit nucleophilen und hydrophoben Aminosäureseitenketten als auch mit Nucleosiden möglich. Die kurze Halbwertszeit des Carbens verhindert auch bei hohem Substratüberschuß unspezifische konzentrationsabhängige Nebenreaktionen außerhalb der Substratbindestelle.

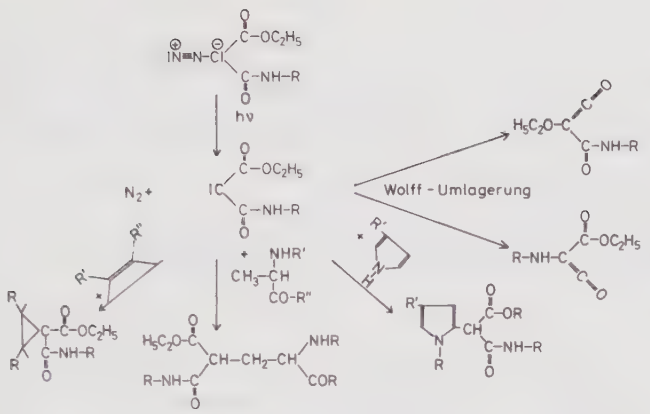


Abb. A 2. Mögliche Reaktionen von Diazomalonestern

Zur Charakterisierung der ribosomalen tRNA-Bindestellen im Bereich der Peptidyltransferase wurde ein photoreaktives N-Acyl-Phe-tRNA-Derivat, Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA, synthetisiert und in der Bindung an E.coli-Ribosomen untersucht. Die N-Acyl-Gruppe dieser substratanalogen Peptidyl-tRNA sollte mit dem katalytischen Zentrum der Peptidyltransferase in Wechselwirkung treten und mit einer UV-induzierten kovalenten Bindung die Lokalisierung dieses Bereiches der tRNA-Bindestellen ermöglichen (Abb. A 3).

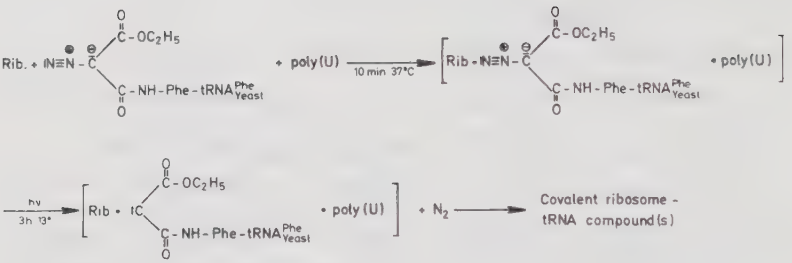


Abb. A 3. Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung ribosomaler tRNA-Bindestellen mit Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA

Auch Pyrimidin- und Purinbasen werden durch UV-Bestrahlung (λ < 290 nm) in einen angeregten Molekülzustand versetzt (Kochetkov und Budowsky, 1972; Calvert und Pitts, 1966), der verschiedene chemische Reaktionen ermöglicht (Setlow, 1968; Smith, 1974). Die Quantenausbeute der Photoreaktion von Pyrimidinen ist dabei wesentlich größer als von Purinbasen (Φ Pyrimidin $\sim 10^{-3}$, Φ Purin $\sim 10^{-4}$) und führt in wässriger Lösung vorwiegend zur Dimerisierung oder zur Addition von Wasser an die 5,6-Doppelbindung. Biologische Bedeutung hat vor allem die UV-induzierte Dimerisierung von Thymin-Basen in nativer DNA.

In neueren Untersuchungen wurde die photochemische Reaktion von Nucleinsäuren mit Aminosäuren zum Nachweis spezifischer Wechselwirkungen im stabilen Komplex zwischen Nucleinsäuren und Proteinen, wie DNA und DNA-Polymerase (Markovitz, 1972),

tRNA und spezifischer Synthetase (Schoemaker und Schimmel, 1974), Lac-Repressor und Lac-Operon (Lin und Riggs, 1974) sowie Cyclo-AMP und Rezeptor (Antonoff und Ferguson, 1974) beschrieben. Die photoinduzierte kovalente Substratbindung setzt voraus, daß die Reaktionspartner in entsprechendem Bindungsabstand und in günstiger Orientierung zueinander angeordnet sind. Im Gegensatz zur klassischen Photoaffinitätsmarkierung, bei der ein eigens eingeführtes verbrückendes Reagenz das Substratmolekül mit molekularen Komponenten der Bindestelle verknüpft, entspricht diese Photoreaktion einer unmittelbaren Wechselwirkung des unmodifizierten Substratmoleküls mit seiner Bindestelle.

Im ersten Teil der Arbeit wird die photochemische Markierung von 23S-RNA durch Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA beschrieben. Im zweiten Teil wird dann eine photochemische irreversible Bindung von unmodifizierter Valin-spezifischer tRNA (E.coli) an ribosomale 16S-RNA berichtet.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien und sonstiges Material

L-[^{3}H]Phenylalanin (spez. Akt. = 770 Ci/Mol); L-[^{14}C]Phenylalanin (spez. Akt. = 513 Ci/Mol); L-[^{3}H]Valin (spez. Akt. = 1813 Ci/Mol); [^{3}H]H_2O (spez. Akt. = 2 Ci/ml); [^{3}H]Puromycin (spez. Akt. = 370 Ci/Mol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
$tRNA^{Phe}$ (Hefe), $tRNA_1^{Val}$ (E.coli) Poly(U), Poly(U_2,G) RNase A aus Pankreas (Rind)(EC 2.7.7.16), RNase T_1 aus Aspergillus oryzae (EC 2.7.7.26)	Boehringer, Mannheim
RNase A, an CM-Cellulose gebunden ("Enzite-RNase")	Miles, England
Alkalische Phosphatase aus E.coli (EC 3.1.3.1)	Worthington, England
Sephadex G 25, DEAE-Sephadex A 25	Pharmacia, Schweden
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin STAINS ALL Aureomycin (7-Chlortetracyclin), Tetracyclin, Puromycin	Serva, Heidelberg
Thiostrepton	Squibb, USA
Acrylamid, Methylen-N,N'-bisacrylamid Dodecylsulfat, Na-Salz (SDS) Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Ilvesheim

Harnstoff	Baker, Holland
Nitrocellulose-Membranfilter (0,4 µm Porenweite, 23 mm ∅)	Sartorius, Göttingen oder Schleicher & Schüll, Dassel
GF/A-Filter	Whatman, England
2,5-Diphenyloxazol (PPO) Unisolve 1	Koch-Light Lab., England
DC-Fertigplatten, Cellulose (0,10 mm Schichtdicke) und Kieselgel 60 (0,25 mm Schichtdicke)	Merck, Darmstadt
Proteinase K (aus Tritirachium album)	

Gebräuchliche Chemikalien, soweit sie hier nicht aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2. Präparation von Ribosomen

E.coli MRE 600-Zellen wurden bei Wachstum unter limitierender Belüftung aus der logarithmischen Wachstumsphase bei A_{550} = 0,7 gewonnen und nach Noll et al. (1973) bis zu den 70S-Ribosomen aufgearbeitet. Sie wurden fünfmal mit 0,5 M Ammoniumchlorid in Standard-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) gewaschen und in flüssigem Stickstoff oder in einer Tiefkühltruhe bei -70°C gelagert. Die Trennung der Ribosomen-Untereinheiten wurde nach Leifer und Kreuzer (1971) im Anschluß an eine Dialyse gegen Dissoziations-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,7 mM $MgCl_2$, 0,2 mM K-EDTA, 20 mM KCl) ausgeführt.

3. Aminoacylierung von tRNA

Die enzymatische Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ (Hefe) erfolgte, wie beschrieben (Matthaei et al., 1966), mit einer angereicherten Enzymfraktion aus Bäckerhefe (v. der Haar, 1972). Der erreichte Beladungsgrad variierte zwischen 55 und 64%. Valin-spezifische tRNA ($tRNA_1^{Val}$ (E.coli)) wurde analog mit Hilfe einer gereinigten S-100-Fraktion (Heller, 1966) zu 30,5% mit [^{3}H]Val bzw. zu 28,4% mit [^{14}C]Val beladen.

4. Darstellung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$

Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ wurde durch N-Acylierung von Phe-$tRNA^{Phe}$ mit Diazomalonsäureäthyl-N-hydroxysuccinimidester dargestellt (vgl. Bispink, 1973; Bispink und Matthaei, 1976). Die Synthese des Acyl-N-hydroxysuccinimidesters veranschaulicht Abb. B 1. Die Umsetzung von Phe-$tRNA^{Phe}$ (Hefe) mit Diazomalonsäure-äthyl-N-hydroxysuccinimidester führt in Gegenwart von Dimethylsulfoxid und 10 mM $MgCl_2$ bei 4°C zu nahezu quantitativer Acylierung der N-α-Aminogruppe des Phenylalanins, wobei weniger als 10% der Reaktion in unspezifischer Weise mit dem tRNA-Molekül ablaufen (Abb. B 2).

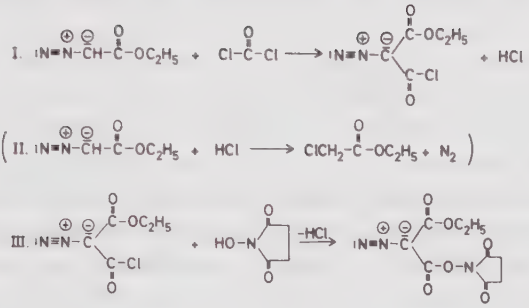


Abb. B 1. Synthese von Diazomalonsäure-äthyl-N-hydroxy-succinimidester

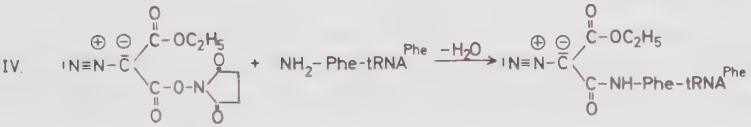


Abb. B 2. Darstellung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$

a. Synthese von Diazomalonsäure-äthylester-chlorid

Eine Lösung von 0,15 Mol (17 g) Diazoessigester in 50 ml Toluol wurde in einem Abzug unter Rühren und Kühlen in Eis zu 25 ml einer 20%igen Lösung von Phosgen (0,05 Mol) in Toluol zugetropft. Nach 2 h bei $4^{o}C$ wurde die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde eine weitere Stunde gerührt, bis Stickstoff entwich. Überschüssiges Phosgen und das Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Bei $30^{o}C$ ging im Ölpumpenvakuum

Chloressigester über. Der Rückstand enthielt das Rohprodukt und wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverarbeitet.

b. Synthese von Diazomalonsäure-äthyl-N-hydroxysuccinimidester

Das rohe Diazomalon-äthylestersäure-chlorid (vgl. a.) wurde in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 10 g N-Hydroxysuccinimid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 4°C gekühlt, und es wurden vorsichtig unter Rühren 4 ml Pyridin in 30 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nicht umgesetztes N-Hydroxysuccinimid wurde abfiltriert, danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand ließ sich aus Isopropanol/Petroläther umkristallisieren. Rekristallisation aus Methylenchlorid/Petroläther ergab 6,5 g (51%) Diazomalonsäure-äthyl-N-hydroxysuccinimidester.

F_p : 114°C

Elementaranalyse:

$C_9H_9O_6N_3$, berechnet: C 42,36, H 3,56, N 16,47, O 37,62
gefunden : C 42,42, H 3,54, N 16,46, O 37,56

IR(KBr) : 2115 cm^{-1} (Diazo-stretch Bande)

NMR($CDCL_3$) : Triplett (3H) bei δ = 1,2 - 1,45 ppm
Singulett (4H) bei δ = 2,96 ppm, Quadruplett (2H) bei δ = 4,17 - 4,53 ppm

UV(Methanol) : λ_{max} = 253 nm (ε_{253} = 5650)

c. Synthese von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$

Eine Lösung von 5 - 10 mg Diazomalonsäure-äthyl-N-hydroxysuccinimidester in 1,5 ml DMSO wurde unter ständigem Schütteln langsam zu einer eisgekühlten Lösung von 2 mg Phe-$tRNA^{Phe}$ (Hefe) (44 - 51,2 nMol Phenylalanin, 55 - 64% Beladung) in 1,2 ml 150 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 10 mM $MgCl_2$ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 4°C 5 h geschüttelt; anschließend wurde die tRNA durch Zugabe von 6 ml vorgekühltem Äthanol (-20°C) gefällt. Nach 20 min bei -20°C wurde die tRNA bei

20 000xg in 10 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet (20 - 30 min). Die getrocknete Substanz wurde in 0,2 ml Elutionspuffer (1 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl) gelöst und zur weiteren Reinigung an Sephadex G 25 chromatographiert. Die unretardierte Fraktion enthielt die tRNA. Die Lösung wurde auf 0,5 mg tRNA/ml eingestellt und bei -20°C gelagert. Das Derivat wurde durch dünnschichtchromatographische Analyse des alkalisch abgespaltenen Acylaminosäureesters charakterisiert (Bispink, 1973). Dazu wurden 2 µl der tRNA-Lösung 30 min bei 37°C mit 3 µl 1M KOH inkubiert und danach auf die Startlinie einer Kieselgel-DC-Fertigplatte (Merck) aufgetragen. Als Vergleichslösungen dienten wässrige Lösungen von Phe, 2,4-Dinitrophenyl-Phe, Acetyl-Phe, N-Acyl-[^{14}C]Phe-tRNA und hydrolysierter [^{14}C]Phe-tRNA. Die Dünnschichtplatte wurde in 2-Butanol : Ameisensäure (90%) : H_2O = 75 : 15 : 10 (v, v, v) entwickelt. R_f-Werte: R_f (Phe) = 0,41, R_f (Äthyl-2-diazomalonyl-Phe) = 0,85, R_f (tRNA) = 0, R_f (FDNB-Phe) = 0,80, R_f (Acetyl-Phe) = 0,89. Die Ausbeute der Acylierung variierte zwischen 80 und 100%. Mehr als 90% der eingesetzten tRNA wurden nach Chromatographie an Sephadex G 25 wiedererhalten.

5. UV-Bestrahlung

Die Photolyse der Reaktionsgemische (Zusammensetzung wie in den Legenden beschrieben) wurde in Reaktionsröhrchen (16 mm ø x 98 mm) aus Schott-Geräteglas 20 (Wandstärke 2 mm) durchgeführt, um die energiereiche Strahlung unterhalb von 300 nm auszufiltern. Die optischen Eigenschaften des Glases zeigt Abb. B 3.

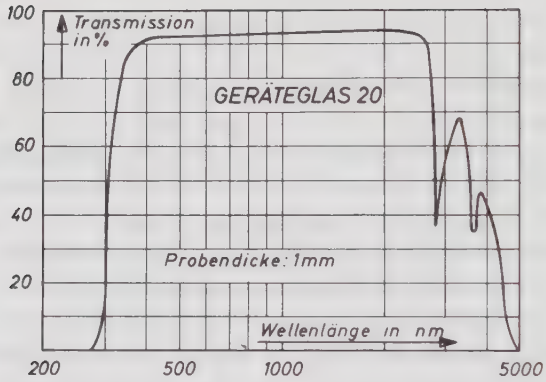


Abb. B 3. Optische Eigenschaften der Reaktionsröhrchen

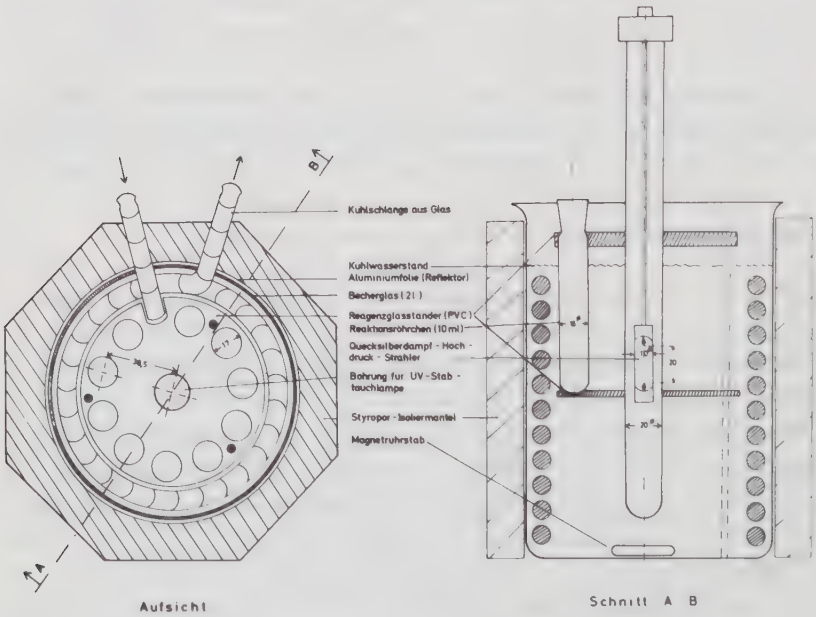


Abb. B 4. UV-Bestrahlungsapparatur

In der UV-Bestrahlungsapparatur nach Abb. B 4 sind Röhrchen in einem 2 l-Becherglas (132 mm ϕ x 186 mm) konzentrisch um eine Quecksilbertauchlampe (Quecksilber-Hochdruckstrahler Typ Q 81, 70 W, Quarzlampen GmbH, Hanau) im Abstand von 2 cm angeordnet. Zur Kühlung wurde Quarz-destilliertes Wasser verwendet, das von einem Kryomaten durch eine Kühlschlange gepumpt wurde. Im Becherglas wurde intensiv gerührt. Die UV-Intensität wurde nach Hatchard und Parker (1956) durch chemische Aktinometrie mit Kalium-oxalo(III)-ferrat bestimmt. Die Gesamtmenge der durch Glas eintretenden UV-Strahlung (λ > 300 nm) beträgt in den Reaktionsröhrchen ca. 7 x 10^{17} Quanten/sec. Die relative Energieverteilung in den Quecksilberbanden zwischen 300 und 400 nm (ohne Glasfilter) wurde aus den technischen Daten der Lampe errechnet (Merkblatt der Quarzlampen GmbH, Hanau):

Tab. B 1. Relative spektrale Energieverteilung des Quecksilberdampfhochdruckstrahlers TQ 81 (Quarzlampen GmbH, Hanau):

Wellenlänge λ [nm]	Relative Energie [%]	Strahlstärke [W]*
302	33	1,0
313	71	2,2
334	8	0,25
366	100	3,1

*im Spektralbereich zwischen 300 und 400 nm entspricht 1 W Strahlstärke 1,5 - 2,0 x 10^{18} Lichtquanten/sec.

6. Präparation von Elongationsfaktoren

Die Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-Ts (B. stearothermophilus) und EF-G (E.coli) wurden an DEAE-Sephadex A-50 nach der Methode von Ravel (1968) getrennt und nach Konzentrierung auf Diaflo UM2-Filtern verwendet.

7. Messung der nichtenzymatischen und enzymatischen AA-tRNA-Bindung an Ribosomen

Die Bindung von AA-tRNAs oder Peptidyl-tRNAs an Ribosomen wurde durch Sorption der Komplexe an Membranfilter gemessen. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische sowie die Zeit und Temperatur der Inkubation sind aus den einzelnen Legenden zu ersehen. Nach der Inkubation wurden die Proben mit ca. 5 ml eiskalten Waschpuffers verdünnt, durch Nitrocellulose-filter (Sartorius SM 11336 oder Selectron BA 85, 0,4 µm Porenweite, 23 mm Durchmesser) gesogen und mit 15 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Durch Radioaktivitätszählung der getrockneten Filter wurde nach Abzug der Blindwerte die gebundene Menge an AA-tRNA bestimmt. Zur Vermeidung hoher Blindwerte durch Adsorption von Acyl-Phe-$tRNA^{Phe}$-Derivaten an Nitrocellulose-Filter (Bochkareva et al., 1971) wurden die Filter über Nacht in gesättigte Natriumpyrophosphat-Lösung gelegt und anschließend bis zur Verwendung in der 10-fach verdünnten Lösung aufbewahrt.

8. Messung der mRNA-abhängigen Polypeptidsynthese

Der Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in TCA-fällbare Polypeptide wurde nach der Methode von Bermek und Matthaei (1970) gemessen. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische ist in der Legende zu Abb. C 4 angegeben. Nach der Inkubation wurden 75 µl auf Whatman GF/A-Filter plattiert und in einen der 25 Schlitze eines Teflonkorbes gegeben, der in eiskalter 10%iger Trichloressigsäure stand. Im Korb eingeschlossen wurden die Proben in folgender Reihenfolge gewaschen: bei 90°C 10 min in 5% TCA, bei Raumtemperatur zweimal 1 min in 5% TCA, zweimal 1 min in Äther/Äthanol (1 : 1, v/v), einmal 1 min in Äther. Die Filter wurden unter einem Warmluftföhn getrocknet.

9. Messung der Radioaktivität

Die getrockneten Filter (Whatman GF/A, Sartorius SM 11336 oder Selectron BA 85) wurden in Glaszählröhrchen gelegt, die je 2 ml Zählflüssigkeit enthielten (0,4% 2,5-Diphenyloxazol in Toluol). Die Zählung erfolgte in einem Tricarb-Szintillationsspektrometer (Packard). Die Zählausbeuten wurden jeweils mit radioaktiven Standard-Proben bestimmt und betrugen für ^{3}H zwischen 14,8 und 23,4%, für ^{14}C zwischen 51 und 83,2%. Zur Messung der Radioaktivität auf Dünnschichtplatten wurde die abgeschabte Kieselgel- oder Cellulose-schicht in Eppendorf-Röhrchen überführt, mit 1 ml Wasser suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Trägermaterial wurde abzentrifugiert (2,5 min 16 000 Upm), der wässrige Überstand in Glaszählröhrchen dekantiert und in der 10-fachen Menge an Unisolve (Koch-Light) gezählt. Die Zählausbeuten in Unisolve (10% Wasser) betrugen 14,5 - 19,4% bei ^{3}H und 49 - 79,5% bei ^{14}C. Die Mengen an markierter Substanz wurden anhand der spezifischen Aktivität und der gemessenen Ipm nach folgender Formel berechnet:

$$pMol = \frac{Ipm \times 100}{\text{Zählausbeute } \left[\frac{Ipm \times 100}{Zpm}\right] \times 2{,}22 \left[\frac{Zpm}{pCi}\right] \times \text{spez. Akt. } \left[\frac{pCi}{pMol}\right]}$$

10. Messung der irreversiblen Bindung von Acyl-Phe-tRNA^{Phe}-Derivaten an Ribosomen

0,1 ml-Reaktionsgemische modifizierter Ribosomen wurden 30 min bei 37°C mit 0,1 µg RNase A in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM K-EDTA pH 7,0 inkubiert. 75 µl-Aliquote wurden auf Whatman GF/A-Filter plattiert und in einen der 25 Schlitze eines Teflonkorbes (nach Matthaei, Firma Schleicher & Schüll) gegeben, der in eiskalter 10%iger Trichloressigsäure stand. Im Korb eingeschlossen wurden die Proben in folgender Reihenfolge bei Raumtemperatur gewaschen: zweimal 1 min in 5% TCA, zweimal 1 min in Äther/Äthanol (1 : 1, v/v), einmal 1 min in Äther. Die Filter wurden unter einem Warmluftföhn getrocknet.

11. Analytische Trennung ribosomaler Untereinheiten

Modifizierte 70S-Ribosomen (24 A_{260}-E.) wurden 3 h bei 42 000 Upm (150 000xg) abzentrifugiert. Die pelletierten Ribosomen-Komplexe wurden in 0,2 ml Puffer B (0,3 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 30 mM NH_4Cl, 1 mM DTT) unter langsamem Schütteln bei 4°C über Nacht gelöst und auf einem 5 - 20%igen Zuckergradienten in Puffer B (17,5 ml) aufgetragen. Nach 14-stündiger Zentrifugation bei 24 000 Upm (im Beckman-Rotor, Typ SW 25.3) wurden die Gradienten mittels eines Perfusors (Braun, Melsungen) mit 40%iger Zuckerlösung aus den Zentrifugenröhrchen getrieben und in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Gleichzeitig wurde die Extinktion in der Durchflußküvette eines Photometers (Zeiss, PMQ II) registriert. Zur Radioaktivitätsbestimmung im Tricarb-Szintillationszähler wurden 0,1 ml-Aliquote mit 0,4 ml Wasser verdünnt und dann mit 5 ml Unisolve versetzt. Zur Isolierung der Untereinheiten wurden die entsprechenden 30S- und 50S-Fraktionen des Zuckergradienten mit dem 2,5fachen Volumen auf -20°C vorgekühlten Äthanols gefällt. Nach 1 h Stehens bei -20°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert (20 min, 4 000 Upm) erneut in Puffer B aufgenommen und noch einmal mit vorgekühltem Äthanol gefällt. Die Pellets wurden anschließend 30 min im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet.

12. Essigsäure-Extraktion von Proteinen

100 µl einer Lösung mit 50 - 250 pMol 70S-Ribosomen in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurde mit 10 µl 1 M $MgCl_2$ und 200 µl Essigsäure (Eisessig) versetzt und 40 min bei 4°C im Kühlraum geschüttelt. Die präzipitierte RNA wurde in 15 min bei 4000 Upm in einer Christ-Laborzentrifuge pelletiert. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden 50 µl-Aliquote des Essigsäure-Überstandes auf GF/A-Filter plattiert und die Proteine, wie unter B 10 beschrieben, mit kalter 10%iger TCA gefällt.

13. Isolierung ribosomaler RNA

Die rRNA wurde nach Traub et al. (1971) durch Extraktion der Proteine mit Phenol/SDS gewonnen: Ribosomen-Pellets (24 A_{260}-E. 70S) wurden in 0,1 ml Puffer B (0,3 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 30 mM NH_4Cl, 1 mM DTT) unter langsamem Schütteln bei 4°C über Nacht gelöst. Die Lösung wurde mit 0,1 ml Na-Citrat/EDTA-Puffer (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA pH 7,0), 20 µl 2%iger Bentonit-Suspension und 5 µl 10%iger SDS-Lösung versetzt und mit 0,2 ml wassergesättigtem Phenol 5 min bei 4°C geschüttelt. Die beiden Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4 000 Upm) getrennt. Die Phenol-Extraktion der wässrigen Phase wurde zweimal wiederholt. 200 - 250 µl RNA-Lösung wurden jeweils auf einen 5 - 20%igen Zuckergradienten in Na-Citrat/EDTA-Puffer (17,5 ml) aufgetragen und 20 h bei 24 000 Upm in einem Spinco-Rotor SW 25.3 zentrifugiert. Die Gradienten wurden wie unter B 11 beschrieben fraktioniert.

14. Analytische Spaltung von 23S-RNA in zwei Fragmente

10 µl einer Lösung von 50S-Untereinheiten (50 - 100 µg) in Puffer B (0,3 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM NH_4Cl, 1 mM DTT) wurden 60 min bei 0°C mit 3 µg CM-Cellulose-gebundener RNase A ("Enzite") inkubiert (Eppendorf-Röhrchen). Das Reaktionsgemisch wurde zur Extraktion der Proteine mit einem gleichen Volumen Phenol (mit Puffer B äquilibriert) und 0,5% SDS versetzt (vgl. B 12) und 5 min unter gelegentlichem Schütteln in Eis stehengelassen. Nach kurzer Zentrifugation (2,5 min, 16 000 Upm, Eppendorf-Zentrifuge) zur Trennung der beiden Phasen wurde die wässrige RNA-Lösung auf ein 2,4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe B 15).

15. Auftrennung von rRNA-Spaltprodukten in Polyacrylamid-Gelen

Die elektrophoretische Trennung der Abbauprodukte von 23S-RNA erfolgte nach Bishop et al. (1967). Zur Herstellung von 2,4%igen Polyacrylamid-Gelen wurden 4 ml einer wässrigen Acrylamid-Stammlösung (15% Acrylamid und 0,75% Bis-acrylamid) mit 12,45 ml Wasser und 8,33 ml Puffer E (360 mM Tris, 180 mM Na-Acetat, 90 mM K-EDTA mit 18 ml Essigsäure (100%) auf pH 7,2 eingestellt) verdünnt. Die Lösung wurde im Exsikkator unter Vakuum entgast und zur Polymerisation mit 0,02 ml TEMED und 0,2 ml 10%iger Ammoniumperoxidisulfat-Lösung versetzt. Mit einer Einmal-Spritze wurde diese Gel-Lösung ohne Luftblasen in die mit Parafilm verschlossenen Gelröhrchen (6 mm ⌀ x 12,5 cm) gefüllt. Während der Polymerisation wurden die Gele mit 0,1 - 0,2 ml Wasser überschichtet, um ebene Oberflächen zu erhalten. Es wurden ca. 50 µg RNA in 50 µl Elektroden-Puffer (17 µl Puffer E mit H_2O auf 50 µl verdünnt) mit 10% Saccharose aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei Raumtemperatur mit 5 mA/Gel für 4 h (bei 70 V) mit Elektroden-Puffer, der 0,2% SDS enthielt. Die Gele wurden nach der Methode von Dahlberg et al. (1969) mit "stains all" angefärbt. Die densitometrische Auswertung der Gele erfolgte mit einem Vitatron-Densitometer TLD 100 bei 605 nm (Vorschub 3 cm/min). Die Gele wurden anschließend mit einem Gelschneider nach Pfeiffer (1973) in 3 mm-Scheibchen geschnitten. Die Gelstücke wurden mit 0,5 ml H_2O_2 (30%) bei 50°C über Nacht gelöst. Die Radioaktivität in den wässrigen Proben wurde nach Zugabe von je 10 ml Unisolve im Tricarb-Szintillationsspektrometer gemessen. Die Zählausbeute betrug 15,5% für ^3H und 39,2% für ^{14}C.

16. Messung einer irreversiblen Bindung von Val-$tRNA^{Val}$ an Ribosomen

50 µl-Reaktionsgemische wurden mit 5 ml Puffer D (0,1 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 30 mM NH_4Cl) verdünnt und 20 min bei

0°C zur vollständigen Dissoziation der ribosomalen Komplexe stehengelassen. Danach wurden die Proben durch Membranfilter (Selectron BA 85) gesogen und mit 25 ml Puffer D nachgewaschen. Der ohne UV-Reaktion ermittelte Blindwert (ca. 250 Ipm) wurde abgezogen.

17. Tritiierung von $tRNA^{Val}$

Ein Reaktionsansatz mit 50 A_{260}-E. $tRNA^{Val}$ wurde in 60 µl $[^3H]H_2O$ (1,65 Ci/ml) mit 40 mM Na-Cacodylat-Puffer pH 6,5, 165 mM NaCl, 1 mM EDTA, 11 mM $MgCl_2$ in einem 2 ml-Einschlußrohr 20 min bei 90°C inkubiert und danach langsam abgekühlt (von 90°C - 45°C in 30 min). Das Reaktionsgemisch wurde mit 0,5 ml bidest. Wasser verdünnt. Danach wurde die tRNA mit 2,5 Volumina auf -20°C vorgekühlten Äthanols gefällt und in 10 min bei 20 000xg isoliert. Das Sediment wurde 20 min im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet, in 0,2 ml 1 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl gelöst und an Sephadex G 25 chromatographiert. 70% der eingesetzten tRNA wurden in der unretardierten Fraktion mit einer spezifischen Aktivität von 41 Ci/Mol erhalten.

18. Spaltung von $tRNA^{Val}$ mit RNase T_1

a. T_1-RNase Abbau von kovalent gebundener $[^{14}C]$Val-$[^3H]tRNA^{Val}$

Gemäß Abb. D6 mit $[^{14}C]$Val-$[^3H]tRNA^{Val}$ modifizierte und im Zuckergradienten getrennte 30S-Untereinheiten (1 nMol) wurden durch Äthanol-Fällung isoliert (2,5-faches Volumen Äthanol, 1 h bei -20°C; Zentrifugation 20 min bei 4 000 Upm) wie in Abschnitt C. 11 beschrieben. Das Sediment wurde in 0,1 ml 50 mM NH_4-Carbonat-Puffer pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA aufgenommen, 2 A_{260}-E. $tRNA^{Val}$ wurden als Vergleichssubstanz zugesetzt, dann 3 h bei 37°C mit 50 E. RNase T_1 und 50 µg bakterieller alkal. Phosphatase inkubiert. Zur Analyse der Oligonucleotide wurde die hydrolysierte RNA von Proteinen und Ribonucleoprotein-Komplexen - der größte Teil der 30S-

Untereinheit wird unter den oben angegebenen Inkubationsbedingungen nicht abgebaut - durch Membranfiltration befreit. Dazu wurde das Reaktionsgemisch durch Membranfilter gesogen (Selectron BA 85, 0,4 µm, 9 mm ∅) und dreimal mit je 50 µl Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet, der Rückstand in 5 µl Wasser aufgenommen und 1 µl-weise auf eine Cellulose DC-Fertigplatte (20 x 20 cm, Merck) aufgetragen.

b. Referenz-System

Für die vergleichende Auswertung der T_1-Spaltprodukte von nichtmodifizierter $tRNA^{Val}$ und UV-bestrahlter $tRNA^{Val}$ waren in dem Reaktionsgemisch nach a. anstelle der modifizierten 30S-Untereinheiten 8 A_{260}-E. normale 30S-Untereinheiten sowie 0,25 A_{260}-E. [^{14}C]Val-[^{3}H]$tRNA^{Val}$ bzw. UV-bestrahlte 0,25 A_{260}-E. [^{14}C]Val-[^{3}H]$tRNA^{Val}$ (3 h UV-Bestrahlung in Puffer A) enthalten. Sonstige Bedingungen wie unter a. beschrieben.

19. Dünnschichtchromatographische Trennung der Oligonucleotide von $tRNA^{Val}$

Ein RNase T_1-Hydrolysat von 2,0 - 3 A_{260}-E. $tRNA^{Val}$ in 5 - 10 µl Wasser wurde 2 cm vom Rand entfernt in der linken unteren Ecke einer Cellulose-DC-Platte (20 cm x 20 cm, Merck) 1 µl-weise aufgetragen. 4 Platten wurden gemeinsam in einem DC-Tank (Degussa) zweimal in der 1. Dimension mit dem Fließmittel n-Propanol : H_2O : NH_3 = 55 : 35 : 10 (v,v,v) 5 und 6 h entwickelt. Nach dem ersten Lauf wurden die Platten unter einem Kaltluftstrom getrocknet und das Fließmittel erneuert. In der 2. Dimension wurde zweimal mit iso-Buttersäure : H_2O : NH_3 = 66 : 33 : 1 (v,v,v) (5 und 6 h) getrennt. Die Oligonucleotid-Flecken wurden unter der UV-Lampe (λ = 254 nm) angezeichnet. Zur weiteren Analyse wurde die Cellulose-Schicht an den markierten Flecken mit einem Spatel abgeschabt und mit Wägepapier in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Oligonucleotide wurden mit 1 ml Wasser eluiert, wie unter B. 9 beschrieben.

20. Analyse der Oligonucleotide

10 µl Lösung der nach B. 19 isolierten Oligonucleotide (ca. 0,1 - 0,5 A_{260}-E.) wurden mit 25 µg alkalischer Phosphatase und 5 µg Schlangengiftdiesterase in 150 mM Ammonium-Acetat-Puffer pH 8,8, 15 mM $MgCl_2$ 8 h bei 37°C hydrolysiert. Die Nucleotide wurden mit dem Nucleosidanalysator nach Uziel et al. (1968), wie von Gassen und Leifer (1970) näher beschrieben, analysiert.

21. UV-Absorptionsspektren

Spektroskopische Messungen bei festeingestellten Wellenlängen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. Spektren wurden mit einem Shimadzu-Spektralphotometer UV 200 registriert.

C. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG VON 23S-rRNA MIT ÄTHYL-2-DIAZO-MALONYL-PHE-tRNA

1. Komplexbildung zwischen Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA und 70S-Ribosomen

Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA wurde durch N-Acylierung von Phe-tRNA mit Diazomalonyl-äthyl-N-hydroxysuccinimidester nach bekannten Methoden (Lapidot et al., 1967; Bispink, 1973, B 4) in quantitativer Ausbeute synthetisiert. Die Aktivität der substratanalogen Peptidyl-tRNA im nichtenzymatischen Standard-Bindesystem mit E.coli Ribosomen ist aus Abb. C 1 zu ersehen.

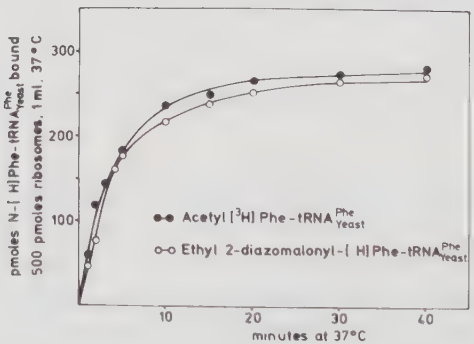


Abb. C 1. Kinetik der Bindung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA und Acetyl-Phe-tRNA. 1 ml-Reaktionsgemische enthielten 1,4 nMol Acetyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} oder Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe}, 100 µg Poly(U) und 500 pMol Ribosomen in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 60 mM KCl (Puffer A). Es wurden jeweils 100 µl-Aliquote entnommen und die Sorption der Komplexe an Membranfiltern gemessen, wie im methodischen Teil beschrieben. Die ohne Zusatz von Poly(U) erhaltenen "Ribosomenblindwerte" wurden abgezogen.

2. Irreversible Bindung von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA an 70S-Ribosomen

Unter Einwirkung von ultravioletter Strahlung wird die Diazo-Gruppe des Diazomalonyl-Derivates abgespalten. Das intermediär entstehende Carben ist aufgrund seiner hohen Reaktionsfähigkeit geeignet, kovalent mit unmittelbar benachbarten Reaktionspartnern zu reagieren (vgl. Abb. A 2 und A 3). Zur irreversiblen Bindung des photoreaktiven tRNA-Derivates wurde der mit Ribosomen in Gegenwart von Poly(U) gebildete Komplex mit UV-Wellenlängen > 300 nm bestrahlt, wie im methodischen Teil unter B 5 beschrieben. Der Nachweis einer kovalenten Bindung an Ribosomen durch deren Sorption nach Dissoziation der Komplexe an Membranfilter - wie für die irreversible Bindung von Val-tRNA beschrieben (B 16) - ist aufgrund der großen Bindeaffinität für N-Acyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ (Bispink, 1973) sowie durch unspezifische Filter-Adsorption sehr ungenau und daher für quantitative Bestimmungen nicht geeignet. Die Ermittlung des irreversiblen Bindungsanteils gelang durch partiellen RNase-Abbau (Enzym : Substrat = 1 : 20 000) der tRNA nach Dissoziation des Komplexes. Ribosomale RNA wird unter diesen Bedingungen nicht oder nur geringfügig hydrolysiert. Das makromolekulare Material wurde auf Glasfaser-Filtern (Whatman GF/A) mit Trichloressigsäure gefällt. Die auf dem Filter nachweisbare Radioaktivität entspricht kovalent an ribosomale Komponenten gebundenem N-Acyl-[^{3}H]Phe-Adenosin. Abb. C 2 zeigt die Kinetik der UV-induzierten irreversiblen Bindung von Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA an Ribosomen.

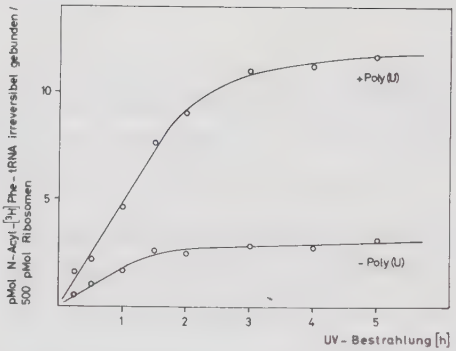


Abb. C 2. Kinetik der UV-induzierten irreversiblen Bindung von Acyl-Phe-tRNA an Ribosomen. 500 pMol Ribosomen wurden mit 1,4 nMol Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} 10 min bei 37^{o}C in 1 ml-Reaktionsgemischen - wie in der Legende zu Abb. C 1 beschrieben - inkubiert, abgekühlt und dann bei 13^{o}C UV-bestrahlt. Es wurden jeweils 100 µl-Aliquote entnommen und der irreversible Bindungsanteil bestimmt, wie unter B 10 beschrieben.

Die Ausbeute an Produkt der kovalenten Verknüpfung ist zunächst direkt proportional zur eingestrahlten UV-Dosis und erreicht nach 3 h mit etwa 5% der reversibel gebundenen tRNA ihr Maximum. Ohne UV-Einstrahlung bleibt der ribosomale Komplex vollständig reversibel. Eine - im Prinzip mögliche - UV-unabhängige Reaktion des tRNA-Derivates findet demnach nicht statt.

3. Spezifische Markierung von 23S-rRNA

Zur Analyse des Reaktionsproduktes wurden die Proteine des modifizierten Komplexes nach limitiertem RNase-Abbau (B 10) mit Essigsäure extrahiert (Hardy et al., 1969; B 12). In der Proteinfraktion war nur ein geringer Anteil des irreversibel gebundenen Substrates nachweisbar, während nahezu die gesamte Radioaktivität im rRNA-Sediment der Essigsäurefraktionierung verblieb (Tab. C 1).

Tab. C 1. Kovalente Bindung von N-Acyl-Phe-tRNA an ribosomale Proteine und rRNA.
Reaktionsbedingungen wie in der Legende zu Abb. C 2 beschrieben.

pMol N-Acyl-Phe-tRNA^{Phe} kovalent gebunden / 500 pMol Ribosomen		
	Proteinfraktion	rRNA
mit Poly(U)	0,5	9,4 ::
ohne Poly(U)	0,2	2,5

:: Nach vollständigem Abbau mit 1 000 E. RNase A (wie in B 10 beschrieben, jedoch mit 2 µg RNase A / 100 µl, 30 min 37°C) war im TCA-fällbaren Material weniger als 0,2 pMol N-Acyl-Phe / 500 pMol Ribosomen enthalten.

Die rRNA modifizierter Ribosomen wurde nach Traub et al. (1971) mit Phenol/SDS isoliert und durch Sedimentation in einem 5 - 20%igen Zuckergradienten aufgetrennt (Abb. C 3).

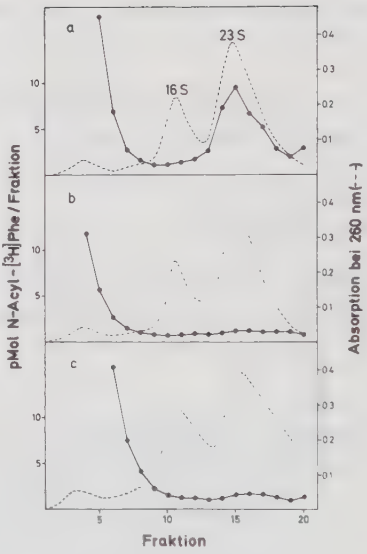


Abb. C 3. Poly(U)-abhängige Photoreaktion von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA^{Phe} mit 23S-rRNA. 1,5 nMol Ribosomen in 3 ml Puffer A wurden 10 min bei 37°C mit 3 nMol Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]-Phe-tRNA^{Phe} (spez. Akt. = 770 Ci/Mol) und 0,3 mg Poly(U) inkubiert, in Eis abgekühlt und 3 h bei 13°C UV-bestrahlt. Die rRNA wurde isoliert und in einem 5 - 10%igen Saccharose-Gradienten wie beschrieben aufgetrennt (B 13). b. wie a., jedoch war im Reaktionsgemisch kein Poly(U) enthalten. c. Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} war im Reaktionsgemisch durch Acetyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} ersetzt. • — • = Radioaktivität, umgerechnet in pMol [^{3}H]Phe; - - - = Absorption bei 260 nm.

Wie aus Abb. C 3a ersichtlich, sedimentiert ein der irreversiblen Bindung entsprechender Anteil der radioaktiv markierten RNA mit der 23S-RNA. Die kovalente Bindung ist vollständig von der gleichzeitigen Anwesenheit von Poly(U) im Reaktionsgemisch abhängig (Abb. C 3b). Die Reaktion des tRNA-Derivates findet demnach ausschließlich in dem spezifischen Komplex [Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA · 70S-Ribosom · Poly(U)] statt. Das negative Kontrollexperiment mit Acetyl-Phe-tRNA (Abb. C 3c) bestätigt die Vermutung, daß die N-Acyl-Phe-tRNA über die

photoreaktive Diazomalonylester-Gruppe an die 23S-RNA gebunden wird.

In Ergänzung zu diesen Befunden zeigte sich, daß die Reaktionsfähigkeit der photoreaktiven tRNA durch Vorbestrahlung (3 h UV) in einem Reaktionsgemisch ohne Ribosomen vollständig verloren geht. Damit wird der eingangs beschriebene (Teil A) Reaktionsablauf der Photoaffinitätsmarkierung bestätigt; eine "Pseudo"-Photoaffinitätsmarkierung,wie von Ruoho (1973) beschrieben,kann aufgrund der geringen Halbwertszeit des Carbens weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Radioaktivität im oberen Teil des Gradienten (Abb. C 3) entspricht reversibel gebundenem Substrat. Um eine kovalente Bindung an 5S-rRNA auszuschließen, wurden die entsprechenden Fraktionen der 5S-rRNA vereinigt und durch Äthanol-Fällung bei $-20^{\circ}C$ isoliert, wie im methodischen Teil (B 11) beschrieben. Die Pellets wurden in 0,3 ml 0,3 M Tris-HCl pH 9,0 gelöst und 2 h bei $37^{\circ}C$ inkubiert, um die Esterbindung des mit der tRNA verknüpften N-Acyl-Phenylalanins zu hydrolysieren (Heller, 1966). Anschließend wurde die RNA auf GF/A-Filtern mit Trichloressigsäure gefällt, und die Radioaktivität bestimmt (B 9). Tab. C 2 zeigt die entsprechenden Ausbeuten an makromolekular gebundenem [^{3}H]Phenylalanin.

Tab. C 2. Kovalente Bindung von N-Acyl-[^{3}H]Phenylalanin an 4S- und 5S-RNA und 23S-rRNA (nähere Erläuterungen im Text)

pMol [^{3}H]Phenylalanin kovalent gebunden/500 pMol Ribosomen		
	4S- und 5S-RNA	23S-rRNA
ohne Hydrolyse	202	11,2
nach Hydrolyse mit 0,3 M Tris-HCl pH 9,0, 2 h 37°C	0,6	10,3

Die Radioaktivität in den 4S- und 5S-Fraktionen entspricht demnach nahezu vollständig der im alkalischen pH-Bereich hydrolysierbaren N-Acyl-[^{3}H]Phe-tRNA. Die kovalente Bindung der photoreaktiven N-Acyl-Phenylalanin-Gruppe an die 23S-rRNA ist dagegen relativ stabil.

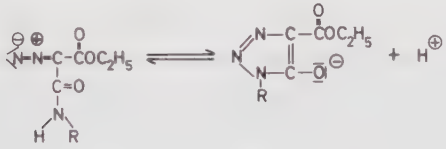
4. Einfluß veränderter Reaktionsbedingungen auf die Ausbeute an irreversibel gebundener tRNA

Etwa 5% der im Komplex gebundenen Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA-Moleküle reagieren mit der 23S-RNA. Verschiedene theoretische Überlegungen mögen diese niedrige Reaktionsausbeute erklären:

a. Die Halbwertszeit der reaktiven Zwischenprodukte photolysierter Diazo-amide ist sehr kurz (< 1 msec) und im wässrigen Reaktionsmedium entstehen deshalb überwiegend Hydrolyse-Produkte.

b. Der Austausch des Substrates im (reversiblen) Komplex [N-Acyl-Phe-tRNA · 70S-Ribosom · Poly(U)] ist aufgrund der hohen Bindungskonstante für Peptidyl-tRNA nur sehr gering (Bispink, 1973). Einmal im Komplex photolysierte N-Acyl-Phe-tRNA wird daher nicht gegen photoreaktives Substrat ausgetauscht und blockiert so die weitere Reaktion.

c. Diazo-amide werden im alkalischen wässrigen Medium zu 1,2,3-Triazolen umgelagert (Dimroth, 1910) und verlieren dadurch ihre UV-Reaktivität:



Von dieser Überlegung ausgehend wurde der Einfluß des pH auf die Ausbeute an kovalent gebundener tRNA untersucht. Wie Sander (1968) zeigte, ist das Ausmaß der Bindung von Phe-tRNA an Poly(U)-gesättigte Ribosomen zwischen pH 5,0 und pH 7,5 nahezu konstant. Die Ausbeute an kovalent gebundener N-Acyl-Phe-tRNA nimmt dagegen im sauren pH-Bereich zu, gleichzeitig wird aber ein Teil der Spezifität eingebüßt (Tab. C 3). Ein Optimum des Reaktionsumsatzes ohne wesentliche Erhöhung des Blindwertes wird bei pH 6,5 erreicht. Die Aktivität des Poly(Phe)-synthetisierenden Systems wird durch die Erniedrigung des pH-Wertes (pH 6,5) nicht beeinflußt (vgl. Abb. C 4). In den folgenden Versuchen wurde die Reaktion deshalb bei diesem "optimierten" pH-Wert durchgeführt.

Tab. C 3. Ausbeute der Photoreaktion von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ mit Ribosomen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

pMol N-Acyl-Phe-$tRNA^{Phe}$ kovalent gebunden / 100 pMol Ribosomen					
	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,4	Quarzglas statt G 20-Glas
mit Poly(U)	4,1	3,85	3,5	2,4	0,88
ohne Poly(U)	2,3	0,9	0,6	0,5	0

0,5 ml-Reaktionsgemische mit 250 pMol Ribosomen, 50 µg Poly(U) und 700 pMol Äthyl-2-diazomalonyl-[^{14}C]Phe-$tRNA^{Phe}$ (spez. Akt. = 513 Ci/Mol) in 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NH_4Cl, 1 mM DTT und 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5 oder – wenn angegeben – 10 mM K-Acetat-Puffer pH 5,0, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,0 bzw. Tris-HCl-Puffer pH 7,4 wurden 10 min bei 37°C inkubiert, in Eis abgekühlt und 3 h bei 0°C UV-bestrahlt. Die kovalente Bindung von N-Acyl-Phe-tRNA an Ribosomen wurde in 100 µl-Aliquoten bestimmt, wie unter B 10 beschrieben. Die Reaktion in Quarzglas erfolgte bei pH 6,5.

Das Absorptionsmaximum der Diazomalonylester-Gruppe liegt bei 253 nm (Cooperman, 1973, Bispink, 1973). Die Einstrahlung ultravioletten Lichtes kürzerer Wellenlängen sollte demnach eine effektivere Photolyse ermöglichen. In der Tat ist die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der Photolyse in Quarzröhrchen um den Faktor 6 größer als bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 300$ nm. Die Ausbeute der Photoreaktion von Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA erreicht unter

diesen Bedingungen nach 25 min UV-Einstrahlung einen Maximalwert mit 1,2 pMol N-Acyl-Phe-$tRNA^{Phe}$/100 pMol Ribosomen, nimmt jedoch bei weiterer UV-Einstrahlung wieder ab. Vermutlich führt die energiereiche Strahlung unterhalb von 300 nm zur photochemischen Spaltung von molekularen Komponenten des Ribosoms und einer Änderung der nativen Konformation durch Quervernetzung ribosomaler Komponenten (C 5, siehe unten).

5. Einfluß der UV-Bestrahlung auf die Aktivität der Ribosomen

UV-Bestrahlung von Ribosomen mit kurzwelligem Licht der Wellenlänge 253,7 nm führt bei einer Dosis von mehr als 10^{20} Lichtquanten zur photochemischen Quervernetzung ribosomaler Proteine und Nucleinsäuren (Gorelic, 1975); damit werden die Ribosomen unfähig zu einer Peptidsynthese (Kagawa et al., 1967, Ebert et al., 1970). Die Bestrahlung der Ribosomen unter den Bedingungen der Photoaffinitätsmarkierung führt dagegen zu keinem Aktivitätsverlust (Abb. C 4).

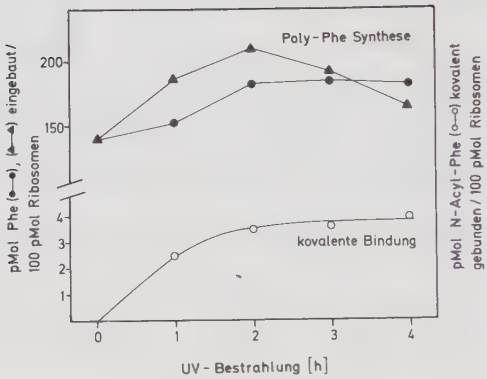


Abb. C 4. Kontrolle auf mögliche Einflüsse von langwelliger UV-Bestrahlung auf die Aktivität von Ribosomen. Test: Polyphenylalanin-Synthese.
a. (• — •): 250 pMol Ribosomen, 0,7 nMol Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} (spez. Akt. = 770 Ci/Mol) und 50 µg Poly(U) in 0,5 ml-Reaktionsgemischen mit 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1mM DTT wurden 10 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und bei 0°C UV-bestrahlt. 100 µl-Aliquote wurden entnommen und 20 min bei 37°C mit 0,5 nMol [^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} (spez. Akt. = 513 Ci/Mol), 50 µg S-100 und 0,5 mM GTP inkubiert. 75 µl wurden auf GF/A-Filter plattiert, mit TCA gefällt und bei 90°C hydrolisiert, wie in B 8 beschrieben.
b. (o — o) wie a., jedoch wurden 100 µl-Aliquote nicht mit [^{14}C]Phe-tRNA inkubiert, sondern zur Bestimmung kovalent gebundenen N-Acyl-[^{3}H]Phenylalanins mit RNase A inkubiert wie in B. 10 beschrieben.
c. (Δ — Δ) wie a., jedoch ohne Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA^{Phe}.

6. Puromycin-Reaktivität von kovalent gebundener N-Acyl-Phe-tRNA

Die irreversible Bindung von N-Acyl-Phe-tRNA findet – abhängig von der Photolyse der Diazo-Gruppe – im Komplex [N-Acyl-Phe-tRNA · 70S-Ribosom · Poly(U)] statt. So mag die Poly(U)-abhängige Markierung der 23S-rRNA durch die substratanaloge Peptidyl-tRNA eine spezifische Affinitätsmarkierung einer oder auch mehrerer tRNA-Bindestellen bedeuten. Die relativ geringe Ausbeute der Reaktion (max. 7% des komplexgebundenen Substrates wird irreversibel gebunden) schließt jedoch nicht aus, daß eine Modifikation nur an nichtfunktionellen Ribosomen erfolgt. Unter den Voraussetzungen, daß die N-Acyl-Phe-tRNA in einer funktionell aktiven Position der Donor-Stelle gebunden wurde, und daß gleichzeitig die Aktivität der Peptidyltransferase durch die Modifikation unbeeinflußt blieb (C 5), sollte die enzymatische Übertragung der kovalent gebundenen N-Acyl-Phenylalanyl-Gruppe auf ein Acceptor-Substratmolekül wie Puromycin oder AA-tRNA möglich sein (Oen et al., 1973; Hsiung et al., 1974; Greenwell et al., 1974). Ribosomen wurden mit unmarkierter Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA modifiziert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit [^{3}H]Puromycin inkubiert (Tab. C 4). Etwa 40% der kovalent gebundenen N-Acyl-Phe-tRNA werden in der Folgereaktion auf Puromycin übertragen (Tab. C 4). Im Elongationssystem (mit S-100 und GTP) reagieren etwa 75% der fixierten Peptidylgruppe. Da für die Peptidyltransferase-Reaktion weder GTP noch Translokationsfaktor erforderlich ist (Monro et al., 1969), mag die Stimulierung der

Puromycin-Reaktion durch Elongationsfaktoren ein Hinweis darauf sein, daß sich ein Teil der kovalent gebundenen N-Acyl-Phe-tRNA nicht in der Donor-Stelle befindet, jedoch in die Puromycin-sensitive Position translokiert werden kann.

Tab. C 4. Puromycin-Reaktivität von kovalent gebundener N-Acyl-Phe-tRNA

pMol N-Acyl-[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} kovalent gebunden/100 pMol Ribosomen::	pMol[^{3}H]Puromycin kovalent gebunden/100 pMol Ribosomen	
		+ S-100, + GTP
+ Poly(U)	3,5	1,5	2,6
- Poly(U)	0,6	0,8	1,0

::Diese Werte wurden der Tab. C 3 entnommen.

0,5 ml-Reaktionsgemische mit 250 pMol Ribosomen, 50 µg Poly(U) und 0,7 nMol Äthyl-2-diazomalonyl [^{12}C]Phe-tRNA^{Phe} in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurden 15 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und 3 h bei 0°C UV-bestrahlt. 100 µl-Aliquote wurden mit 0,01 mMol [^{3}H]Puromycin (spez. Akt. = 370 Ci/Mol) und – wenn angegeben – 50 µg S-100 und 0,5 mM GTP 30 min bei 37°C inkubiert. 75 µl wurden auf GF/A-Filter plattiert und mit TCA gefällt, wie unter B 10 beschrieben.

7. Kovalente Bindung von Peptidsynthese-Produkten an 23S-rRNA

Ähnlich der Modellreaktion mit Puromycin (C 6) sollte die an der 23S-rRNA fixierte N-Acyl-Phenylalanyl-Gruppe im Poly(U)-gesättigten Ribosomen-Komplex auf Phe-tRNA übertragbar sein. Der Komplex [Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA · 70S-Ribosom · Poly(U)] wurde photolysiert und danach mit [^{14}C]Phe-tRNA inkubiert. Die Trennung der modifizierten Ribosomen in Untereinheiten (Abb. C 5) zeigt, daß nunmehr mindestens eine weitere Aminosäure an die 50S-Untereinheit gebunden wurde. Die gelelektrophoretische Analyse der rRNA (Abb. C 6) ergab, daß das Peptidsynthese-Produkt kovalent mit der 23S-rRNA verknüpft wurde.

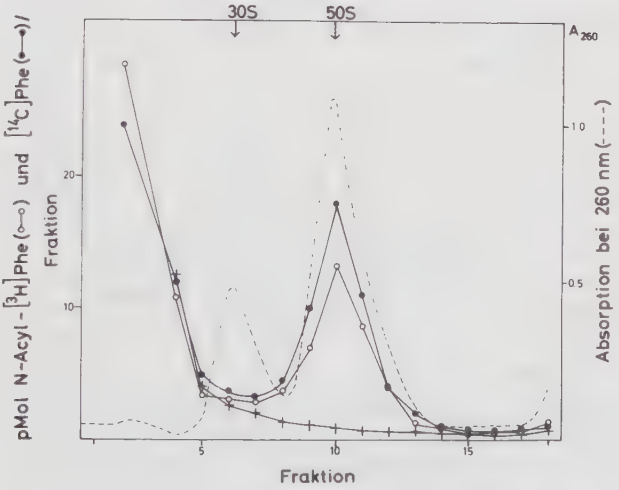


Abb. C 5. Lokalisation von kovalent gebundenen Peptidsynthese-Produkten an der großen Untereinheit. (Legende siehe nächste Seite)

a. (o – o), (· – ·): 500 pMol Ribosomen wurden 10 min bei 37°C mit 1,5 nMol Äthyl-2-diazomalonyl-[^{3}H]Phe-tRNA^{Phe} und 100 µg Poly(U) in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT inkubiert, in Eis abgekühlt und 3 h bei 0°C UV-bestrahlt. Anschließend wurden die Reaktionsgemische mit 2 nMol [^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} 20 min bei 37°C inkubiert. Die Ribosomen wurden durch Zentrifugation isoliert und durch Sedimentation in einem 5 - 20%igen Saccharose-Gradienten in Untereinheiten getrennt (B 11).
b. (+ – +), Kontroll-Versuch ohne Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA^{Phe}.

8. Lokalisation der N-Acyl-Phe-tRNA-Markierung im 3'-terminalen Fragment der 23S-rRNA

An CM-Cellulose gebundene Ribonuclease A spaltet die 23S-rRNA im Ribonucleoprotein-Komplex unter geeigneten Bedingungen in zwei ungleiche Fragmente (Allet und Spahr, 1971). Das größere Abbauprodukt mit einer Sedimentationskonstante von 18S trägt das 3'-Ende der 23S-rRNA, das kleinere 13S-Fragment das 5'-Ende. Die RNA-Fragmente modifizierter 50S-Untereinheiten (Abb. C 5) wurden in SDS-Polyacrylamidgelen nach Bishop et al. (1967) getrennt. Etwa die Hälfte der 23S-rRNA konnte gespalten werden, ohne daß neben den beiden Fragmenten weitere Abbauprodukte entstanden. Wie Abb. C 6b zeigt, verbleibt ein Teil der Markierungen in der 23S-Bande. Das Peptid erscheint jedoch vollständig im 18S-Fragment. Kovalent gebundenes Peptid erleichtert demnach vermutlich die Spaltung der 23S-rRNA. Die Analyse zeigt, daß eine spezifische Bindung der N-Acyl-Phe-

tRNA in dem 3'-terminalen 18S-Fragment der 23S-rRNA erfolgt. Der überwiegende Teil des photoreaktiven Substrats wird in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der Peptidyltransferase kovalent an die 23S-rRNA gebunden, ohne die Peptidyltransferase-Aktivität zu zerstören.

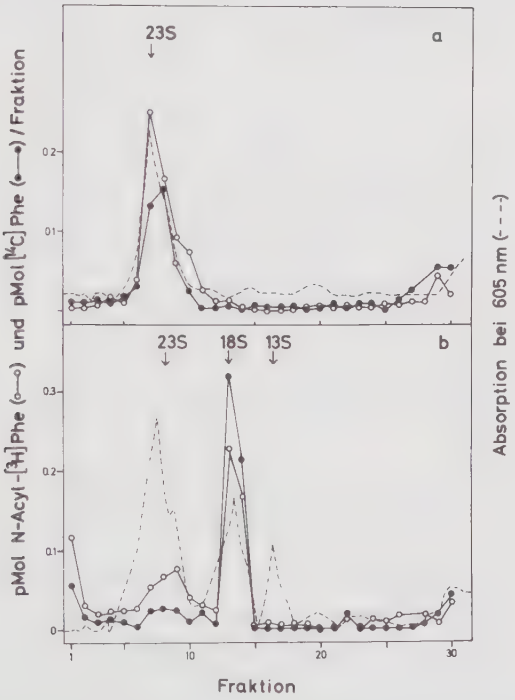


Abb. C 6. Lokalisation von kovalent gebundenen Peptidsynthese-Produkten am 3'-terminalen 18S-Fragment von 23S-rRNA durch gelelektrophoretische Trennung. Gemäß Abb. C 5 modifizierte 50S-Untereinheiten (300 - 400 pMol) wurden durch Äthanol-Fällung isoliert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer B (0,3 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM NH_4Cl, 1 mM DTT) gelöst.
(Fortsetzung der Legende nächste Seite)

a. 5 µl-Aliquote wurden nach vorheriger Phenol/SDS-Extraktion auf Polyacrylamidgele geschichtet und elektrophoretisch getrennt (B 15).

b. 10 µl-Aliquote wurden 60 min bei 0°C mit 3 µg an CM-Cellulose gebundener RNase A inkubiert (B 14). Nach Extraktion der Proteine mit einem gleichen Volumen Phenol/SDS (B 12) wurde die RNA auf einem 2,4%igen Polyacrylamidgel über 4 h bei Raumtemperatur mit 5 mA/Gel aufgetrennt (B 15).

D. UV-INDUZIERTE IRREVERSIBLE BINDUNG VON VALIN-SPEZIFISCHER tRNA AN 16S-rRNA

In Fortführung der in Teil C beschriebenen Affinitätsmarkierung des Peptidyltransferasezentrums wurde versucht, andere Wechselwirkungen der tRNA mit ihren ribosomalen Bindestellen zu lokalisieren. Die Photoreaktivität von Purin- und Pyrimidinbasen ist seit langem bekannt (Übersichtsartikel: Kochetkov und Budowsky, 1972; Smith, 1974). Bestrahlung von Ribosom-gebundenen Derivaten verschiedener tRNAs (hier nicht näher beschriebene Vorversuche) führte zur Entdeckung einer UV-induzierbaren irreversiblen Bindung einer Valin-spezifischen tRNA (E.coli) an E.coli-Ribosomen.

1. Irreversible Bindung von Val-tRNA^{Val} (E.coli) an 70S-Ribosomen

Die nichtenzymatische Bindung von Val-tRNA$_1^{Val}$ wird durch Poly(U_2,G) stimuliert. Im reversiblen Komplex mit Ribosomen werden unter substratsättigenden Bedingungen (2,5facher Substratüberschuß) 0,54 pMol Val-tRNA^{Val} je pMol 70S-Ribosomen mRNA-abhängig gebunden. UV-Bestrahlung ($\lambda > 300$ nm) des Komplexes führt zur irreversiblen Bindung der tRNA in einer Ausbeute von 40 - 50% der komplexgebundenen tRNA (Abb. D 1).

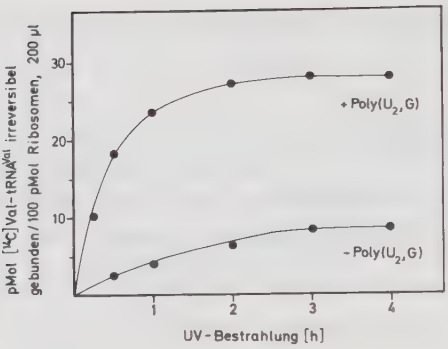


Abb. D 1. Kinetik der UV-induzierten irreversiblen Bindung von Val-$tRNA_1^{Val}$ (E.coli) an Ribosomen. 1 ml-Reaktionsgemische mit 500 pMol Ribosomen, 750 pMol [^{14}C]Val-$tRNA^{Val}$ (spez. Akt. = 209 Ci/Mol) und 100 µg Poly(U_2,G) in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurden 15 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und bei 0°C photolysiert. Es wurden jeweils 100 µl-Aliquote entnommen und die Sorption an Membranfiltern nach Dissoziation der Komplexe gemessen, wie unter B 16 beschrieben.

Die irreversible Bindung findet hierbei nicht über ein verbrückendes Reagenz mit möglicherweise artifizieller sterischer Orientierung statt, sondern entspricht einer direkten Wechselwirkung der tRNA mit ribosomalen Komponenten. In vivo wird AA-tRNA über einen ternären Komplex mit Elongationsfaktor T und GTP (Gordon, 1969; Shorey et al., 1969) ans Ribosom gebunden. Die Stimulierung der enzymatischen Bindung durch die Elongationsfaktoren EF-Tu·Ts zeigt Abb. D 2.

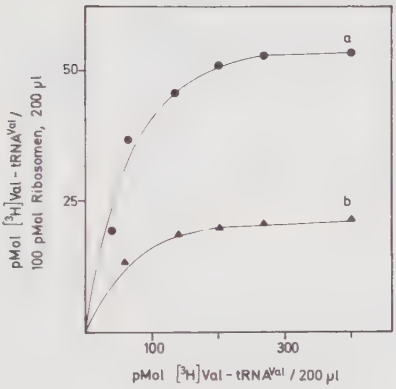


Abb. D 2. Substratsättigungskurven für die enzymatische a. und nicht-enzymatische Bindung b. von Val-$tRNA_1^{Val}$ (E.coli).
a. 1 ml-Reaktionsgemische mit 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NH_4Cl, 1 mM DTT enthielten 500 pMol Ribosomen, 100 µg Poly(U_2,G) sowie [^{3}H]Val-$tRNA_1^{Val}$ (spez. Akt. = 1813 Ci/Mol) wie angegeben, ferner 100 µg EF-Tu·Ts (B. stearothermophilus) und 0,4 mM GTP; 0,1 ml-Reaktionsgemische wurden 20 min bei 37°C inkubiert.
b. wie a., jedoch ohne EF-Tu·Ts und GTP.

Die Ausbeute der EF-Tu-abhängigen irreversiblen Bindung erreicht mit zunehmender Substratkonzentration einen Sättigungsbereich, wobei der Reaktionsumsatz anscheinend von der Bildung des reversiblen Komplexes abhängt (Abb. D 3). Demzufolge wirddie AA-tRNA in einer spezifischen Reaktion innerhalb des ribosomalen Komplexes kovalent gebunden.

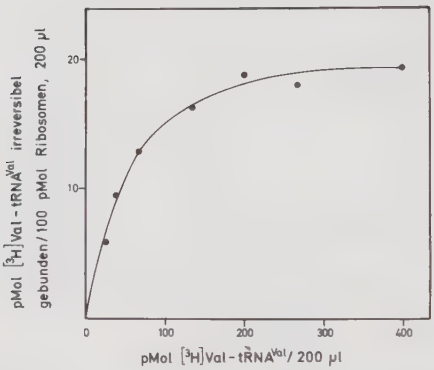


Abb. D 3. Substratsättigungskurve der irreversiblen Bindung von Val-$tRNA_1^{Val}$ (E.coli) nach enzymatischer Bindung. 100 µl-Reaktionsgemische enthielten 50 pMol Ribosomen und [^{3}H]Val-$tRNA_1^{Val}$ (spez. Akt. = 1815 Ci/Mol), 10 µg EF-Tu·Ts (B. stearothermophilus), 0,4 mM GTP in 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT. Die Reaktionsgemische wurden 20 min bei 37°C inkubiert, in Eis gekühlt und nach Entnahme von 50 µl-Aliquoten (zur Blindwert-Bestimmung) 2 h bei 0°C UV-bestrahlt.

2. Lokalisation der spezifischen Reaktion an der 16S-rRNA

Zur Identifizierung der markierten ribosomalen Komponenten wurden modifizierte Ribosomen in ihre Untereinheiten getrennt (Abb. D 4; siehe nächste Seite). Die Radioaktivität im oberen Teil des Gradienten (Fraktion 1 - 3 ≙ 4S) entspricht reversibel gebundenem Substrat. Ein etwa ebenso großer Anteil Val-$tRNA^{Val}$ (= 116,5 pMol Val-$tRNA^{Val}$/500 pMol Ribosomen) sedimentiert mit den 30S-Untereinheiten. Diese Bindung wird

durch UV-Bestrahlung induziert (vgl. Abb. D 4c) und ist nahezu vollständig durch Poly(U_2,G) codiert.

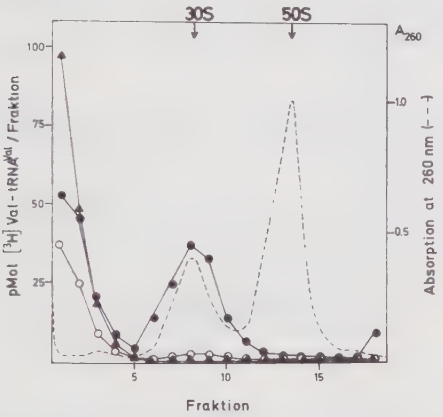


Abb. D 4. Irreversibile Bindung von Val-$tRNA_1^{Val}$ an 30S-Untereinheiten.
a. (· — ·) 1 ml Reaktionsgemisch mit 500 pMol-Ribosomen, 1 nMol [^{14}C]Val-$tRNA_1^{Val}$ (spez. Akt. = 209 Ci/Mol), 100 µg Poly(U_2,G) in 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurden 15 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und 2 h bei 0°C UV-bestrahlt. Die Ribosomen wurden durch Zentrifugation isoliert und wie unter B. 11 beschrieben, in Untereinheiten getrennt.
b. (o — o), wie a., jedoch ohne Poly(U_2,G)
c. (Δ — Δ), wie a., jedoch ohne UV-Bestrahlung.

Eine photochemische Reaktion von Nucleinsäuren ist prinzipiell sowohl mit Aminosäureseitenketten von Proteinen als auch mit Purin- und Pyrimidinbasen möglich (Smith, 1974). Die modifizierten 30S-Untereinheiten wurden aus den 30S-Fraktionen des

Saccharosegradienten (Abb. D 4a, Fraktion 7 - 9) durch Äthanol-Fällung isoliert. Die Proteine wurden daraus nach Hardy et al. (1969) mit Essigsäure extrahiert (B 12). In der Proteinfraktion konnte nur ein geringer Anteil der Radioaktivität nachgewiesen werden (Tab. D 1).

Tab. D 1. Kovalente Bindung von Val-tRNA$_1^{Val}$ an rRNA und Protein aus 30S-Untereinheiten

Extraktionsmethode	pMol Val-tRNA$_1^{Val}$/100 pMol Ribosomen	
	Protein-Fraktion	16S-rRNA
Essigsäure-Extraktion	0,6	-
Phenol/SDS-Extraktion	1,4	23,5*

* Nach enzymatischem Abbau mit Proteinase K (ca. 1,5 m Anson-E./ml = 100 µg/ml, Enzym : Substrat = 1 : 20, 30 min 37°C) wurden 23,7 pMol je 100 pMol Ribosomen gefunden.

Das markierte Reaktionsprodukt verblieb nach Phenol/SDS-Extraktion (B 13) in der wässrigen Phase (RNA-Fraktion). Demnach hat die tRNA mit ribosomaler RNA, nicht aber mit Proteinen der kleinen Untereinheit reagiert. Die Behandlung mit proteolytischen Enzymen führte zu keinem Verlust an makromolekular gebundener Radioaktivität (Tab. D 1, Fußnote). Es scheint damit auch die Möglichkeit ausgeschlossen, daß die tRNA mit Proteinen reagiert, die ihrerseits photochemisch mit rRNA vernetzt werden (Gorelic, 1975, vgl. C 5).

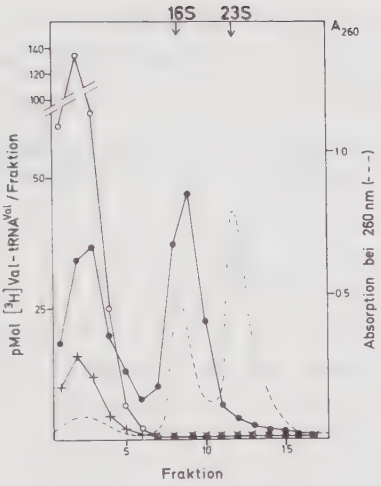


Abb. D 5. Irreversible Bindung von Val-tRNA an 16S-rRNA.
a. (• — •) 1 ml Reaktionsgemisch mit 750 pMol [^{3}H]Val-tRNA$_1^{Val}$ (E.coli), 100 µg Poly(U_2,G), 150 µg EF-Tu·Ts, 0,4 mM GTP und 500 pMol Ribosomen in 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurden 15 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und 3 h bei 0°C UV-bestrahlt. Die Ribosomen wurden durch Zentrifugation isoliert und in Puffer A resuspendiert. Die rRNA wurde, wie unter B 13 beschrieben, isoliert und in einem 5 - 20%igen Zuckergradienten getrennt;
b. (o — o), wie a., jedoch ohne UV-Bestrahlung;
c. (+ — +), wie a., jedoch ohne Poly(U_2,G).

Zum Nachweis des Reaktionsproduktes wurde die ribosomale RNA modifizierter 70S-Ribosomen durch Phenol/SDS-Extraktion (B 13) isoliert und durch Sedimentation im Saccharosegradienten getrennt. Eine dem kovalenten Bindungsanteil (Abb. D 5)

entsprechende Menge an Val-tRNA sedimentiert mit der 16S-RNA. Eine geringfügige Verschiebung des Radioaktivitätsgipfels, die einer größeren Sedimentationskonstante des Reaktionsproduktes entspricht, mag ein Hinweis auf die Kopplung der intakten Ribonucleinsäuren, 4S- und 16S-RNA, sein.

3. Spezifität der enzymatischen Bindung von Val-tRNA

Tetracyclin-Antibiotika hemmen die EF-T-abhängige Bindung an Ribosomen (Lucas-Lenard und Haenni, 1968; Ravel et al., 1969) sowie die nichtenzymatische Bindung an 30S-Untereinheiten (Suzuka et al., 1966; Pestka und Nirenberg, 1966). Wie in Tab.D2 zu ersehen ist, wird die reversible Bindung von Val-tRNA durch Tetracyclin und 7-Chlortetracyclin beträchtlich inhibiert.

Thiostrepton hemmt die Bindung von AA-tRNA und blockiert den Translokationsschritt (Modolell et al., 1971). Der inhibierende Effekt von Thiostrepton auf die komplexe Val-tRNA^{Val}-Bindung gleicht der Wirkung von Tetracyclin. Diese Befunde sprechen für die initielle spezifische Bindung der Val-tRNA in eine oder mehrere tRNA-bindende Decodierstellen (Swan et al., 1969; Swan und Matthaei, 1972; Roufa et al., 1970), und nicht in die Donor-Stelle. Es scheint jedoch prinzipiell möglich, daß die AA-tRNA aus der Acceptorstelle in die Donor-Stelle translokiert wird. Das Antibiotikum Erythromycin ist ein Translokationshemmstoff (Ishitsuka und Kaji, 1970; Tanaka et al., 1973) und führt erwartungsgemäß nicht zu einer Inhibition der

Bindung von Val-tRNA.

Tab. D 2. Einfluß von Antibiotika auf die enzymatische komplexe Bindung von Val-$tRNA^{Val}$ an Ribosomen

	pMol [^{3}H]Val-$tRNA^{Val}$/ 100 pMol Ribosomen	Aktivität [%]
Ohne Antibiotikum	28,8	100
Ohne Antibiotikum, ohne Poly(U_2,G)	5,5	18,5
+ 0,4 mM Tetracyclin	5,95	20,6
+ 0,4 mM 7-Chlortetracyclin (Aureomycin)	2,8	9,7
+ 0,2 mg/ml Thiostrepton	5,8	20,1
+ 1 mM Erythromycin	28,1	97,6

50 µl-Reaktionsgemische mit 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NH_4Cl, 1 mM DTT enthielten 25 pMol Ribosomen, 33 pMol [^{3}H]Val-$tRNA^{Val}$ (spez. Akt. = 1815 Ci/Mol), 5 µg Poly(U_2,G), 5 µg EF-Tu·Ts (B. stearothermophilus), 0,4 mM GTP sowie Antibiotika wie angegeben.

4. Identifizierung kovalent gebundener Oligonucleotide

Zur Beantwortung der Frage, welche Sequenzen der tRNA an der direkten Wechselwirkung mit dem Ribosom beteiligt sind, und deshalb mit der 16S-RNA photochemisch verbrückt werden können, wurde nach der Methode von Schoemaker und Schimmel (1974) kovalent gebundene [^{3}H]tRNA mit Ribonuclease T_1 in Oligonucleo-

tide gespalten; ihre Spaltprodukte wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die $tRNA^{Val}$ wurde nach Gamble und Schimmel (1974) durch Isotopen-Austausch der Wasserstoffatome in Position 8 der Purin-Basen radioaktiv markiert (B 17) und anschließend mit [^{14}C]Valin beladen (B 3). Nach irreversibler Bindung der tritiierten $tRNA^{Val}$ an 70S-Ribosomen (Legende zu Abb. D 6) wurden die modifizierten 30S-Untereinheiten im Saccharosegradienten isoliert (Abb. D 6) und mit Ribonuclease T_1 abgebaut, wie im methodischen Teil beschrieben (B 18).

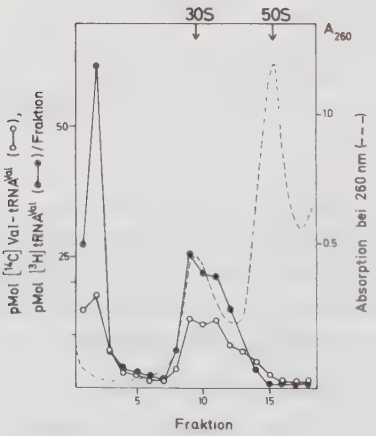


Abb. D 6. Irreversible Bindung von [^{14}C]Val-[^{3}H]$tRNA^{Val}$ an 30S-Untereinheiten. Sedimentationsanalyse eines Aliquots von Material, welches zur Bestimmung der an Ribosomen gebundenen tRNA-Sequenzen benutzt wurde. 1 ml Reaktionsgemisch enthielt 500 pMol Ribosomen, 100 µg Poly(U_2,G) und 2,65 nMol [^{3}H]$tRNA_1^{Val}$ (spez. Akt. = 41 Ci/Mol), zu 14% mit [^{14}C]Val (spez. Akt. = 209 Ci/Mol) be-

laden, in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl, 1 mM DTT. Reaktionsbedingungen und Trennung der Untereinheiten wie in der Legende zu Abb. D 4 angegeben, jedoch 16 h bei 24 000 Upm zentrifugiert.

Zum Nachweis der kovalent mit der 16S-rRNA verbrückten tRNA-Sequenzen wurde die an 30S-Untereinheiten gebundene $tRNA^{Val}$ (vgl. Abb. D 6), wie im methodischen Teil beschrieben (B 18), mit RNase T_1 in Oligonucleotide gespalten. Abb. D 7 zeigt die Sequenz der $tRNA^{Val}$ in der zweidimensionalen Struktur. Die Angriffsstellen der RNase T_1 sind durch Pfeile markiert.

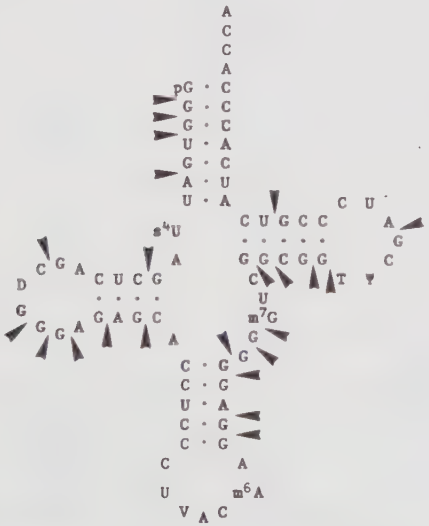


Abb. D 7. Sequenz von $tRNA_1^{Val}$ (E.coli) mit den Angriffsstellen der RNase T_1 (nach Harada et al., 1971)

Um die Identifizierung der tRNA-Abbauprodukte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zu ermöglichen, wurde unmarkierte $tRNA^{Val}$ (2.5 A_{260}-E.) als Vergleichssubstanz zugesetzt.

Unter den Inkubationsbedingungen wird der größte Teil der 16S-RNA im Ribonucleoprotein-Komplex vor dem enzymatischen Abbau geschützt und kann im Komplex mit den Proteinen durch Sorption an Membranfiltern abgetrennt werden.

Die radioaktiv markierten Oligonucleotide wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten nach ihrer Größe und Basenzusammensetzung getrennt (Abb. D 8).

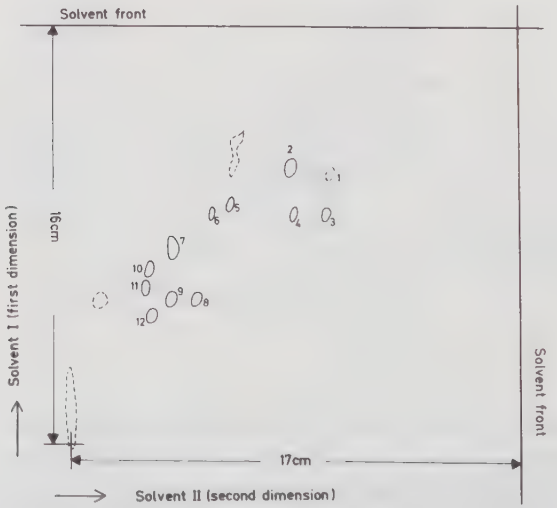


Abb. D 8. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Oligonucleotiden des RNase-T_1-Hydrolysats von $tRNA_1^{Val}$ (E.coli). (Legende nächste S.)

2,5 A_{260}-E. $tRNA_1^{Val}$ (E.coli) und 0,1 A_{260}-E. [^{3}H]$tRNA_1^{Val}$ (spez. Akt. = 41 Ci/Mol) wurden 3 h bei 37°C mit 50 E. RNase T_1 und 50 µg bakterieller alkalischer Phosphatase in 50 µl 100 mM NH_4-Carbonat-Puffer pH 7,5 mit 2 mM K-EDTA pH 7,0 inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde gefriergetrocknet, in 5 µl H_2O aufgenommen und 1 µl-weise auf eine Cellulose-DC-Fertigplatte (Merck), 20 cm x 20 cm, aufgetragen. Fließmittel I (1. Dimension): n-Propanol : H_2O : NH_3 = 55 : 35 : 10 (v,v,v); Fließmittel II (2. Dimension): iso-Buttersäure : H_2O : NH_3 = 66 : 33 : 1 (v,v,v).

Die Identität einzelner Flecken auf dem Chromatogramm wurde durch ihre relative Laufstrecke (Kimura et al., 1971; Budzik et al., 1975) und – soweit für die Zuordnung erforderlich – durch die Analyse des Basenverhältnisses mit Hilfe eines Nucleosidanalysators (Gassen und Leifer, 1970; Uziel et al., 1968; B 20) bestimmt. Zum Nachweis der radioaktiven Markierung einzelner Oligonucleotide wurde die Celluloseschicht der entsprechenden Flecken abgeschabt, mit 1 ml Wasser eluiert und die spezifische Aktivität $\left(\frac{\text{Ipm}}{A_{260}\text{-E.}}\right)$ bestimmt (Tab. D 3), wie unter B. 9 beschrieben.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Oligonucleotiden dieser Kontrollanalyse mit ihren spezifischen Aktivitäten nach photochemischer Reaktion der radioaktiv markierten tRNA ermöglicht die Identifizierung an der Reaktion beteiligter Sequenzen der [^{3}H]tRNA. Entsprechend der kovalenten Verbrückung bestimmter Oligonucleotide der [^{3}H]$tRNA^{Val}$ mit der ribosomalen 16S-RNA sollten in den verbrückten tRNA-Fragmenten aufgrund eines veränderten Laufverhaltens der Reaktionsprodukte geringere spezifische Aktivitäten nachweisbar sein.

Tab. D 3. Radioaktive Markierung einzelner Oligonucleotide des T_1-Hydrolysats von [^{3}H]$tRNA_1^{Val}$ (E.coli) nach chromatographischer Auftrennung (Abb. D 3)

Fleck Nr.	Ipm*	spez. Akt. $\left[\frac{Ipm}{A_{260}\text{-E.}}\right]$
1	113	2460
2	430	2150
3	122	1309
4	30	750
5	41	760
6	66	1650
7	87	2720
8	85	2120
9	65	1000
10	69	1010
11	35	1206
12	77	855

*Ein Blindwert von 30 Ipm ist abgezogen.
Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Oligonucleotide sowie die Messung der Radioaktivität erfolgte wie in der Legende zu Abb. D 8 bzw. unter B. 9 beschrieben.

Um die Relationen der spezifischen Aktivitäten der Oligonucleotide auf verschiedenen DC-Platten vergleichen zu können, obwohl die aufgetragenen Mengen unterschiedliche Ausbeuten an radioaktiv markierter Substanz und "Carrier" enthalten konnten, wurden die auf den Platten gebundenen spezifischen Aktivitäten mit Hilfe des Faktors f korrigiert:

$$f = \frac{\sum_{1}^{12} \text{spez.Akt.}_{\text{Oligonucleotid}}^{\text{Kontrolle}} \left[\frac{Ipm}{A_{260}\text{-E.}}\right]}{\sum_{1}^{12} \text{spez.Akt.}_{\text{Oligonucleotid}}^{\text{UV}} \left[\frac{Ipm}{A_{260}\text{-E.}}\right]}$$

Die relativen Abweichungen in der spezifischen Aktivität der einzelnen Oligonucleotide nach UV-Behandlung gegenüber der Kontrolle (Tab. D 3) wurde nach der Formel berechnet:

$$\Delta \text{ spez. Akt.} = \left(1 - \frac{\text{spez.Akt.}^{\text{UV}}_{\text{Oligonucleotid}} \cdot f \left[\frac{\text{Ipm}}{A_{260}\text{-E.}}\right]}{\text{spez.Akt.}^{\text{Kontrolle}}_{\text{Oligonucleotid}} \left[\frac{\text{Ipm}}{A_{260}\text{-E.}}\right]}\right) \cdot 100 \; [\%]$$

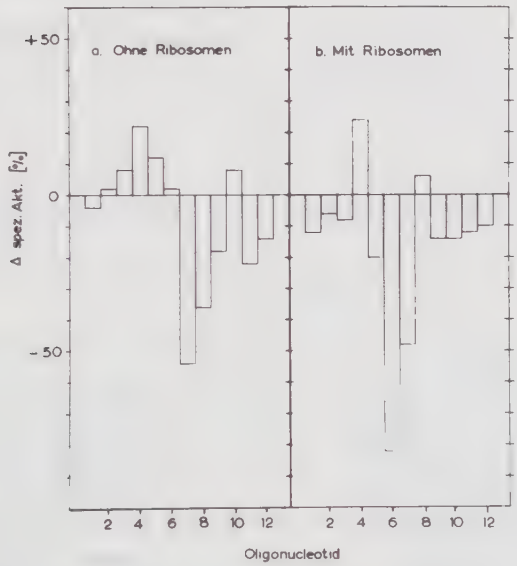


Abb. D 9. Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Menge einzelner Oligonucleotide aus Val-[^{3}H]tRNA$_1^{Val}$ (E.coli) (Kontrolle siehe Tab. D 3 und Text).

a. ohne Ribosomen: 100 pMol [^{3}H]tRNA^{Val} wurden in 40 µl Reaktionsgemisch mit 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT 2 h bei 0°C UV-bestrahlt; Analyse wie in B 18 beschrieben;

b. in Gegenwart von Ribosomen; Analyse wie unter Abb. D 8 sowie unter B 18 beschrieben.

Wie aus Abb. D 9 zu ersehen, führt schon eine UV-Bestrahlung der tRNA allein zu einer signifikanten Abnahme der Radioaktivität bei den beiden Oligonucleotiden Nr. 7 und 8, die vermutlich durch eine photoinduzierte intramolekulare Quervernetzung zwischen dem 4-Thiouridin in Position 8 und dem Cytidin in Position 13 zustandekommt (Yaniv et al., 1969; Ofengand et al., 1974). Nach photochemischer Reaktion von Val-[^{3}H]tRNA^{Val} mit Ribosomen sind die relativen spezifischen Aktivitäten der Oligonucleotide 6 und 7 im Vergleich zur Kontrollanalyse vermindert. Demnach ist das Oligonucleotid 6 (= CDG, B 20) an der Photoreaktion mit 16S-rRNA beteiligt. Dieser Sequenzabschnitt befindet sich in der DHU-Schleife der tRNA^{Val} und ist in der schematischen Darstellung der dreidimensionalen Struktur hervorgehoben (Abb. D 10).

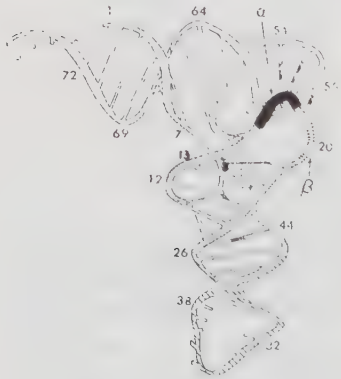


Abb. D 10. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von tRNA (speziell tRNA^{Phe}, Kim et al. (1974)). Die Position des Sequenzabschnittes CDG in tRNA^{Val} ist hervorgehoben.

Die spezifische Aktivität der benachbarten Sequenz CUCAG (Nr. 7) ist sowohl nach UV-Bestrahlung der tRNA allein als auch in Gegenwart von Ribosomen deutlich vermindert. So ist

eine eindeutige Aussage darüber nicht möglich, ob auch diese Sequenz mit der 16S-rRNA verbrückt wird oder aber nur an einer intramolekularen Photoreaktion beteiligt ist. Weiter muß für die Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden, daß in dem Chromatographie-System zwei längere tRNA-Sequenzen – ein Sequenzabschnitt aus dem Bereich des Anticodons sowie das 3'-terminale Ende der tRNA – nicht getrennt werden und vermutlich am Start der DC-Platte zurückbleiben. So kann über eine Beteiligung dieser Sequenzabschnitte an der photochemischen Reaktion keine Aussage gemacht werden.

5. Mechanismus der photochemischen Reaktion von Val-tRNA^{Val} mit 16S-rRNA

Die kovalente Bindung von Val-tRNA^{Val}(E.coli) an 16S-rRNA wird durch langwellige UV-Strahlung ($\lambda > 300$ nm) initiiert. In diesem Spektralbereich absorbiert die Thiouridin-Gruppe in Position 8 der E.coli-tRNA ($\lambda_{max} \sim 335$ nm); nicht angeregt werden dagegen die anderen Pyrimidin- und Purinbasen. Bei der UV-Anregung von Thiouridin entstehen reaktive kurzlebige Photooxidationsprodukte (Pleiss et al., 1969), die in der nativen Konformation der tRNA^{Val} – wie auch anderer tRNAs aus E.coli – mit Cytidin in der Position 13 reagieren (Yaniv et al., 1969; Delaney et al., 1974).

Eine Vorbestrahlung der Reaktionspartner hat nahezu keinen Einfluß auf die Ausbeute an kovalent gebundener tRNA (Tab. D 4).

Tab. D 4. Einfluß einer Vorbestrahlung von Reaktionspartnern auf die UV-induzierte kovalente Bindung von Val-$tRNA_1^{Val}$(E.coli) an 70S-Ribosomen

Vorbestrahlte Komponente(n)	Irreversible Bindung, pMol/100 pMol Ribosomen
Keine	19,5
Val-$tRNA_1^{Val}$	18,6
Ribosomen	17,7
Val-$tRNA_1^{Val}$ und Ribosomen	20,6

a. Vorbestrahlung:
0,55 A_{260}-E. [^{3}H]Val-$tRNA_1^{Val}$(E.coli) bzw. 24 A_{260}-E. 70S-Ribosomen wurden in 50 µl-Reaktionsgemischen mit 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT (Puffer A) 15 min bei 37°C inkubiert, in Eis gekühlt und 3 h bei 0°C UV-bestrahlt (B 5).

b. Irreversible Bindung:
100 µl-Reaktionsgemische mit 75 pMol [^{3}H]Val-$tRNA_1^{Val}$ und 50 pMol Ribosomen – wie unter a. angegeben vorbestrahlt oder nicht – , sowie 10 µg Poly(U_2,G) wurden in Puffer A 15 min bei 37°C inkubiert, abgekühlt und bei 0°C UV-bestrahlt. Die Substratbindung wurde durch Sorption der Ribosomen an Membranfilter gemessen (B 16).

Die Vorbestrahlung von Reaktionsgemischen, in denen einer der beiden Reaktionspartner fehlt, führt in der Photoreaktion nach Zugabe der unbestrahlten Komponente zu einer Abnahme der Ausbeute (Abb. D 11).

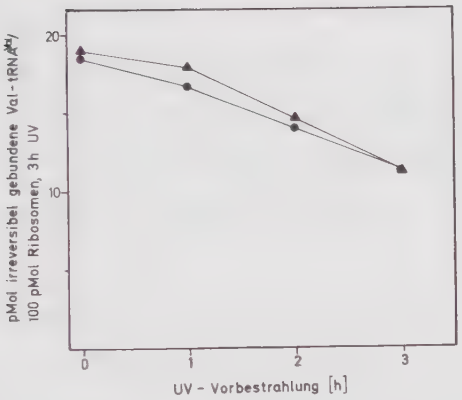


Abb. D 11. Kinetik der Inaktivierung von Reaktionsgemischen durch UV-Vorbestrahlung.
a. (▲ — ▲) Vorbestrahlung ohne Ribosomen
b. (· — ·) Vorbestrahlung ohne Val-tRNA^{Val}. 0,5 ml-Reaktionsgemische mit 375 pMol [^{3}H]Val-tRNA^{Val} a. oder 250 pMol Ribosomen b. und 50 µg Poly(U_2,G) in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-Acetat-Puffer pH 6,5, 100 mM NH_4Cl und 1 mM DTT wurden 15 min bei 37°C inkubiert und UV-bestrahlt. Nach den angegebenen Zeiten wurden 100 µl-Aliquote entnommen; es wurde der fehlende Reaktionspartner zugesetzt und 3 h bei 0°C photolysiert (B 5).

Die Kinetik dieser Inaktivierung verläuft jedoch wesentlich langsamer als die irreversible Bindung der tRNA (Abb. D 1) und scheint einer photoinduzierten Réaktion anderer Reaktionspartner (vielleicht Poly(U_2,G)) zu entsprechen.

E. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß ribosomale RNA – 23S-rRNA im Peptidyltransferasezentrum und 16S-rRNA in einer oder mehreren tRNA-Decodierstellen der 30S-Untereinheit – am strukturellen Aufbau der tRNA-Bindestellen des Ribosoms beteiligt ist.

Die Photoaffinitätsmarkierung mit einem UV-reaktiven Peptidyl-tRNA-Derivat, Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA^{Phe}, ist zum Nachweis einer ribosomalen Komponente im Bereich der Peptidyltransferase geeignet. Die N-Acyl-Gruppe wird in der Photoreaktion kovalent und spezifisch an ein großes (18S) 3'-terminales Fragment der 23S-RNA gebunden. Puromycin wie auch Phenylalanin können in einer Peptidyltransferase-Reaktion auf die irreversibel gebundene Acylaminosäure übertragen werden. Die hiermit geforderte Flexibilität der über den N-Acyl-Rest an rRNA fixierten Peptidylgruppe ist mit der Vorstellung vereinbar, daß die wachsende Peptidkette während des Elongationscyclus an die 50S-Untereinheit gebunden wird, ohne daß der Translokationsschritt beeinträchtigt wird (Malkin und Rich, 1967). Die Peptidyltransferase knüpft die Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe der wachsenden Peptidkette und der Aminogruppe der neu hinzutretenden Aminosäure; demnach sollte die Sequenz der 23S-RNA, an die die N-terminale Acyl-Gruppe gebunden wird, in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums der Peptidyltransferase lokalisiert sein.

Die Affinitätsmarkierung von ribosomalen Substratbindestellen mit alkylierenden (Oen et al., 1973; Sopori et al., 1974; Yukioka et al., 1975) und acylierenden (Czernilofsky et al., 1974; Hauptmann et al., 1974) Peptidyl-tRNA-Derivaten sowie reaktiven substratanalogen Antibiotika (Pongs et al., 1973; Sonenberg et al., 1973; Greenwell et al., 1974) diente zum Nachweis mehrerer Proteine in der Nachbarschaft des Peptidyltransferasezentrums. Bromacetyl-Phe-tRNA reagiert mit den Proteinen L2 und L27 (Oen et al., 1973); das acylierende tRNA-Derivat p-Nitrophenyl-oxicarbonyl-Phe-tRNA markiert L16 und L27 (Czernilofsky, 1974). Jodacetyl-Phe-tRNA reagiert im physiologischen pH-Bereich unter substratsättigenden Bedingungen präferentiell mit den Proteinen L2, L2O und S4 (Bispink, 1973; Matthaei et al., 1973). Unter veränderten Reaktionsbedingungen bei pH 5,O wird jedoch neben mehreren Proteinen spezifisch die 23S-rRNA markiert (Yukioka et al., 1975). Diese unterschiedlichen Ergebnisse entsprechen vermutlich der pH-abhängig veränderten Reaktionsfähigkeit der nuclephilen Reaktionspartner (Gurd, 1967). In gleicher Weise reagiert ein Bromacetyl-Derivat von Puromycin unter substratsättigenden Bedingungen unspezifisch mit ribosomalen Proteinen beider Untereinheiten. Daneben läßt sich jedoch eine spezifische Markierung der 23S-rRNA nachweisen, die mit der Inaktivierung der Peptidyltransferase korreliert und durch Chloramphenicol inhibiert wird (Harris et al., 1973; Greenwell et al., 1974).

Die Kinetik der Reaktion nichtphotoreaktiver alkylierender Peptidyl-tRNA-Derivate scheint einem bimolekularen Mechanismus

(S_N2) zu folgen, jedoch nicht durch die sterisch günstige Orientierung eines geeigneten Reaktionspartners in der Substratbindestelle bestimmt zu werden (Cohen, 1968). Eine spezifische Markierung der ribosomalen Substratbindestelle ist demzufolge nur bei einer niedrigen Substratkonzentration und mit einer entsprechend geringen Ausbeute der irreversiblen Bindung möglich.

Die Photoaffinitätsmarkierung ermöglicht dagegen aufgrund der schnellen und universalen Reaktionsmöglichkeit der photolysierbaren Gruppen eine der Substratbindung direkt entsprechende Reaktion der substratanalogen tRNA. In Übereinstimmung mit einer kürzlich beschriebenen Affinitätsmarkierung von 23S-rRNA (Greenwell et al., 1974; Yukioka, 1975) scheint die kovalente Reaktion der Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNA einer Wechselwirkung des 3'-terminalen CpCpA-Tripletts der tRNA mit einer komplementären Sequenz der 23S-rRNA im Peptidyltransferasezentrum zu entsprechen. Nach Abschluß dieser Arbeit erschienen Berichte über zwei weitere photoreaktive N-Acyl-Phe-tRNA-Derivate (Barta et al., 1975; Sonenberg et al., 1975), die ebenfalls spezifisch mit dem größeren 3'terminalen Fragment der 23S-rRNA reagieren.

Die photoinduzierte Quervernetzung von Val-$tRNA^{Val}$ mit 16S-rRNA sollte eine direkte Wechselwirkung von RNA-Sequenzen in der Substratbindestelle voraussetzen. Von den bisher unter-

suchten tRNAs wird nur die Valin-spezifische tRNA (E.coli) in einer Photoreaktion irreversibel an Ribosomen gebunden, nicht aber Phe-tRNA^{Phe} (E.coli und Hefe), Met-tRNA^{Met} (E.coli) sowie Lys-tRNA^{Lys} (E.coli). Demnach beruht diese photoinduzierte irreversible Bindung nicht auf einer allgemeinen Struktureigenschaft verschiedener tRNAs; sie könnte auf eine spezifische Sequenz oder Base der tRNA^{Val} zurückzuführen sein. Die Sequenz CDG der DHU-Schleife von tRNA^{Val} scheint an der Reaktion mit 16S-rRNA beteiligt zu sein. Eine photochemische Aktivierung von Nucleotiden dieser Sequenz ist durch langwellige UV-Bestrahlung (λ > 300 nm) nicht zu erwarten; in diesem Wellenbereich absorbiert jedoch die Thiouridin-Gruppe in Position 8 der E.coli-tRNA ($\lambda_{max} \sim$ 335 nm). Die Reaktionsfähigkeit der tRNA^{Val} in der photochemischen Bindung an 16S-RNA wird durch Vorbestrahlung der Reaktionspartner nicht verringert; demnach ist die photooxidative Reaktion von Thiouridin, die in der nativen Konformation der tRNA zu einer intramolekularen Quervernetzung mit Cytidin in Position 13 führt (Yaniv et al., 1969), nicht unmittelbar an der Verknüpfung von tRNA und Ribosom beteiligt. Denkbar ist dagegen die Photosensibilisierung einer Dimerisierung benachbarter Pyrimidinbasen der tRNA und der 16S-rRNA durch die Thiouridin-Gruppe (Elad et al., 1967; Lamola und Yamane, 1967; Sawada, 1974).

Ein Derivat der tRNA^{Val} mit einer photoreaktiven p-Azidophenacyl-Gruppe an der Thio-Gruppe in Position 8 der tRNA – Val-p-azidophenacyl-tRNA^{Val} – reagiert nach der EF-Tu-katalysierten Bindung an Ribosomen unter Bestrahlung sowohl mit

Proteinen der 50S-Untereinheit als auch mit 16S-rRNA der 30S-Untereinheit (Schwartz et al., 1975). Die Ausbeute der irreversiblen Bindung ist jedoch relativ gering (3%). Die direkte Photoreaktion der $tRNA^{Val}$ wird demnach durch die Modifikation der Thiouridin-Gruppe verhindert oder resultiert aus veränderten Reaktionsbedingungen. Bemerkenswert scheint jedoch, daß bei der nichtenzymatischen Bindung (20 mM $MgCl_2$) der reaktiven Val-p-azidophenacyl-$tRNA^{Val}$ in die Donor-Stelle eine spezifische Reaktion mit 16S-rRNA in einer Ausbeute von 15 - 20% stattfindet (Schwartz und Ofengand, 1974). Erste Versuche zeigten, daß in Übereinstimmung mit diesem Befund Val-$tRNA^{Val}$ in der Donor-Stelle mit ähnlicher Ausbeute wie in der tRNA-Decodierstelle (50% der reversibel gebundenen tRNA) an die 16S-rRNA gebunden wird.

Die hier diskutierten Ergebnisse sprechen für eine direkte Wechselwirkung der DHU-Schleife der $tRNA^{Val}$ (vgl. Abb. D 10) mit der 16S-rRNA. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob es sich dabei um einen prinzipiellen Erkennungsprozeß im Rahmen der tRNA-Bindung in die ribosomalen Substratbindestellen handelt, etwa analog der vermuteten Basenpaarung zwischen der TΨCG-Schleife der tRNA und einer komplementären Sequenz der 5S-rRNA (Erdmann et al., 1973; Richter et al., 1973). Wichtig erscheint auch die Frage, ob eine oder mehrere Sequenzabschnitte der 16S-rRNA an einer direkten Wechselwirkung mit der tRNA in den Substratbindestellen beteiligt sind.

Noller und Chaires (1972) zeigten, daß die Modifikation von 16S-rRNA mit Kethoxal die Poly(U)-abhängige Bindung von Phe-tRNA beeinträchtigt.

Ebenso wird die Bindeaktivität der Ribosomen durch die Reaktion bestimmter Proteine mit gruppenspezifischen Reagenzien (Ginzburg et al., 1973; Miller und Sypherd, 1973; Shimizu und Craven, 1976) oder durch Blockierung mit Immunglobulin-Fragmenten (Lelong et al., 1974) drastisch verringert. Umgekehrt vermag tRNA einige 30S-Proteine vor enzymatischem Abbau (Rummel und Noller, 1973) sowie 30S- und 50S-Proteine vor der Modifikation durch Fluordinitrobenzol (Beesk, 1976) zu schützen. Obwohl diese Effekte nicht notwendigerweise direkten Wechselwirkungen der tRNA mit den ribosomalen Komponenten entsprechen, sondern auch durch allosterische Konformationsveränderungen induziert werden könnten, so deuten doch viele Ergebnisse übereinstimmend darauf hin, daß Proteine am strukturellen Aufbau der tRNA-Bindestellen beteiligt sind. Nach den hier diskutierten Befunden und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Photoaffinitätsmarkierung dürfte jedoch ein Teil des molekularen Erkennungsprozesses bei der tRNA-Bindung an Ribosomen auf RNA·RNA-Wechselwirkungen beruhen. Diese Vorstellung entspricht dem hypothetischen Modell einer einfachen Matrizenübersetzungsmaschine (Crick, 1968), deren Funktion wesentlich von der komplementären Basenpaarung interagierender RNA-Moleküle abhängt. Erst im Verlauf der Evolution zu höher organisierten Strukturen mögen Proteine hinzugetreten sein, um die Genauigkeit der Übertragung der genetischen Information im Translationsprozeß zu erhöhen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Allet, B. und Spahr, P.F. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 250

Antonoff, R.S. und Ferguson, J.J.Jr. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3319

Bauer, K., Czernilofsky, A.P. und Kuechler, E. (1975) Biochim. Biophys. Acta 395, 146

Beesk, F. (1976) Dissertation, Universität Göttingen

Bermek, E. und Matthaei, H. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1377

Bishop, D.H.L., Claybrook, J.R. und Speigelman, S. (1967) J. Mol. Biol. 26, 373

Bispink, L. (1973) Diplomarbeit, Universität Göttingen

Bispink, L. und Matthaei, H. (1973) FEBS LETTERS 37, 291

Bispink, L. und Matthaei, H. (1976) Methods in Enzymology (in Vorbereitung)

Bochkareva, E.S., Budker, V.G., Girshovich, A.S., Knorre, D.G. und Teplova, N.M. (1971) FEBS LETTERS 19, 121

Bochkareva, E.S., Budker, U.G., Girshovich, A.S., Knorre, D.G. und Teplova, N.M. (1973) Molekul. Biol. (USSR) 7, 278

Budzik, G.P., Lam, S.S.M., Schoemaker, H.J.P. und Schimmel, P. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4433

Calvert, J.G. und Pitts, J.N.Jr. (1966) in Photochemistry (Wiley, New York)

Cohen, L.A. (1970) The Enzymes 1, 147

Cooperman, B.S. und Brunswick, D.J. (1973) Biochemistry 12, 4079

Cooperman, B.S., Jaynes, E.N., Brunswick, D.J. und Ludely, M.A. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2974

Crick, F.H.C. (1968) J. Mol. Biol. 26, 367

Czernilofsky, A., Collatz, E.E., Stöffler, G. und Kuechler, E. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 230

Dahlberg, A.E., Dingman, C.W. und Peacock, A.C. (1969) J. Mol-Biol. 41, 139

Delaney, P., Bierbaum, J. und Ofengand, J. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161, 260

Dimroth, O. (1910) Ann. 373, 131; 377, 349

Ebert, B., Muel, B. und Latarjet, R. (1970) Biochim. Biophys. Acta 204, 275

Ehresmann, B., Reimbolt, J., Ebel, J.P. (1975) FEBS LETTERS 58, 106

Ehresmann, C., Stiegler, P., Fellner, P. und Ebel, J.-P. (1972) Biochimie 54, 901

Elad, D., Kruger, C. und Smidt, G.M. (1967) Photochem. Photobiol. 6, 495

Erdmann, V.A., Sprinzl, M. und Pongs, O. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 942

Fellner, P. (1972) Nature 239, 1

Gamble, R.C. und Schimmel, R.R. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1356

Gassen, H.G. und Leifer, W. (1970) Z. Anal. Chem. 252, 337

Ginzberg, I., Miskin, R. und Zamir, A. (1973) J. Mol. Biol. 79, 481

Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., Kramarov, V.M. und Ovchinnikov, Yu.A. (1974) FEBS LETTERS 45, 213

Gordon, J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5680

Gorelic, L. (1975) Biochim. Biophys. Acta 390, 209; Biochemistry 14, 4627

Greenwell, P., Harris, R.J. und Symons, R.H. (1974) Eur. J. Biochem. 49, 539

Gurd, F.R. (1967) Methods in Enzymology 11, 532

Harada, F., Kimura, F. und Nishimura, S. (1971) Biochemistry 10, 3269

Hardy, S.J., Kurland, C.G., Voynow, P. und Mora, G. (1969) Biochemistry 8, 2897

Harris, R.J., Greenwell, P. und Symons, R.H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 117

Hatchard, C.G. und Parker, C.A. (1956), Proc. Roy. Soc. (London) A 235, 518

Hauptmann, R., Czernilofsky, A.P., Voorma, H.O., Stöffler, G. und Kuechler, E. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 331

Heller, G. (1966) Dissertation, Universität Göttingen

Hsiung, N., Reines, S.A. und Cantor, C.R. (1974) J. Mol. Biol. 88, 841

Ishitsuka, H. und Kaji, A. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 168

Kagawa, H., Fukotome, H. und Kawade, Y. (1967) J. Mol. Biol. 26, 249

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1276

Kim, S.H., Quigley, G.J., Suddath, F.L., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J.J., Weinziere, J. und Rich, A. (1973) Science 179, 285

Kim, S.H., Sussman, J.L., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Wang, A.H.J., Seeman, N.C. und Rich, A. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4970

Kimura, F., Harada, F. und Nishimura, S. (1971) Biochemistry 10, 3277

Kirmse, W. (1964) in Carbene Chemistry Vol. 1 (Academic Press, New York)

Knowles, J.P. (1972) Accounts Chem. Res. 5, 155

Kochetkov, N.K. und Budowsky, E.I. (1972) in Organic Chemistry of Nucleic Acids B 12 (Plenum Press, London-New York)

Lamola, A.A. und Yamane, T. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 443

Lapidot, Y., de Groot, N., Rappoport, S. und Hamburger, A.D. (1967) Biochem. Biophys. Acta 149, 532

Leifer, W. und Kreuzer, T. (1971) Anal. Biochem. 44, 89

Lelong, J.C., Gros, D., Gros, F., Bollen, A., Maschler, R. und Stöffler, G. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 248

Lin, S.-Y. und Riggs, A.D. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 947

Lucas-Lenard, J. und Haenni, A.L. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 554

Maden, B.E. und Monro, R.E. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 309

Malkin, L.I. und Rich, A. (1967) J. Mol. Biol. 26, 329

Markovitz, A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 281, 522

Matthaei, H., Bispink, L., Beesk, F., Doedens, M., Ücer, U. and Bermek, E. (1973) Cold Spring Harbor Ribosomes Meeting 1973, 25

Matthaei, J.H. (1965) Zentralbl. Bacteriol. Orig. 198, 65

Matthaei, J.H., Heller, G., Voigt, H.-P., Kleinkauf, H., Küntzel, H., Vogt, M. und Matthaei, H. (1965) Naturwiss. 52, 653

Matthaei, J.H., Voigt, H.-P., Heller, G., Neth, R., Schöch, G., Kubler, H., Amelunxen, F., Sander, G. und Parmeggiani, A. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 25

Miller, R.V. und Sypherd, R.S. (1973) J. Mol. Biol. 78, 527

Modolell, J., Cabrer, B., Parmeggiani, A. und Vazquez, D. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1796

Monro, R.E. (1971) Methods in Enzymology 20, 472

Monro, R.E., Staehelin, T., Celma, M.L. und Vazquez, D. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 357

Oen, H., Pellegrini, M. Eilat, D. und Cantor, C.R. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2799

Ofengand, J., Bierbaum, J., Horowitz, J., Ou, C.-M. und Ishaq, M. (1974) J. Mol. Biol. 88, 313

Ofengand, J., Delaney, P. und Bierbaum, J. (1974) Methods in Enzymology 29, 673

Noll, M., Hapke, B., Schreier, M.H. und Noll, H. (1973) J. Mol. Biol. 75, 281

Noller, H.F. und Chaires, J.B. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3315

Pellegrini, M., Oen, H. Eilat, D. und Cantor, C.R. (1974) J. Mol. Biol. 88, 809

Pestka, S. und Nirenberg, M. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 641

Pestka, S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4669

Pleiss, M., Ochiai, H. und Cerutti, P.A. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 70

Pongs, O., Bald, R. und Erdmann, V.A. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2229

Pongs, O., Bald, R. Wagner, R. und Erdmann, V.A. (1973) FEBS LETTERS 35, 137

Ravel, J.M., Shorey, R.L., Froehner, S. und Shive, W. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 514

Ravel, J.M., Shorey, R.L., Garner, C.W., Dawkins, R.C. und Shive, W. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 321

Richter, D., Erdmann, V.A. und Sprinzl, M. (1973) Nature 246, 132

Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.D., Clark, B.F.C. und Klug, A. (1974) Nature 250, 546

Roufa, D.J., Skogerson, L.E. und Leder, P. (1970) Nature 227, 567

Rummel, D.P. und Noller, H.F. (1973) Nature 245, 72

Ruoko, A.E., Kiefer, H., Roeder, P.E. und Singer, S.J. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2567

Sawada, F. (1974) Photochem. Photobiol. 20, 523

Schoemaker, H.J.P. und Schimmel, P.R. (1974) J. Mol. Biol. 84, 503

Schwartz, I. und Ofengand, J. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3951

Schwartz, I., Gordon, E. und Ofengand, J. (1975) Biochemistry 14, 2907

Schwarz, U., Lührmann, R. und Gassen, H.G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 807

Seeds, N.W., Retsema, J.A., Conway, T.W. (1967) J. Mol. Biol. 27, 421

Setlow, R.B. (1968) Progr. Nucl. Acid Res. 8, 257

Shafer, J., Baronowsky, P., Laursen, R., Finn, F. und Westheimer, F.H. (1966) J. Biol. Chem. 241, 421

Shaw, E. (1970) The Enzymes 1, 91

Shimizu, M. und Craven, G.R. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 307

Shine, J. und Dalgarno, L. (1975) Nature 254, 34

Shorey, R.A., Ravel, J.M., Garner, C.W. und Shive, W. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4555

Singer, S.J. (1967) Advances in Protein Chemistry 22, 1

Singh, A., Thornton, E.R. und Westheimer, F.H. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3006

Smith, K.C. (1974) in Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, Wang, S.Y. (Hrsg.) (Gordon and Breach, New York)

Sonenberg, N., Wilchek, M. und Zamir, A. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1423

Sopori, M., Pellegrini, M., Lengyel, P. und Cantor, C.R. (1974) Biochemistry 13, 5432

Steinmaus, H., Rosenthal, I. und Elad, D. (1971) J. org. Chem. 36, 3594

Suzuka, I., Kaji, H. und Kaji, A. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 1483

Swan, D. und Matthaei, H. (1971) FEBS LETTERS 17, 215

Swan, D., Sander, G., Bermek, E., Krämer, W., Kreuzer, T., Arglebe, C., Zöllner, R., Eckert, K. und Matthaei, H. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 179

Tanaka, S., Otaka, T. und Kaji, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 331, 128

Traub, P., Mizushima, S. Loury, C.V. und Nomura, M. (1971) Methods in Enzymology 20, 391

Uziel, M., Koh, C.K. und Cohn, W.E. (1968) Anal. Biochem. 25, 77

Vaughan, R.J. und Westheimer, F.H. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91, 217

Voorma, H.O., Benne, R. und Scholte ter Horst, F.H. (1969) J. Mol. Biol. 45, 423

Watson, J.D. (1964) Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1399

Wittmann-Liebold, B. (1973) FEBS LETTERS 36, 247

Wolff, L. (1902) J. Liebigs Ann. Chem. 325, 129

Yanif, M., Favre, A. und Barrell, B.G. (1969) Nature 223, 1331

Yukioka, M., Hatayama, T. und Morisawa, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 390, 192

LEBENSLAUF

Am 19.09.1948 wurde ich als Sohn des Landwirts Albert Bispink und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Naber, in Wilsum geboren.

1955 - 1959	Grundschule in Wilsum
1959 - 1967	Gymnasium Nordhorn (math.-naturwiss. Zweig
1967 - 1968	Grundwehrdienst
WS 1968 - WS 1973	Chemiestudium an der Universität Göttingen
WS 1972 - WS 1973	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin auf dem Gebiet der Biochemie
WS 1973	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung an der Universität Göttingen
WS 1973	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Göttingen
SS 1975	Ärztliche Vorprüfung
WS 1973 - WS 1975	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. H. Matthaei